Modell für die Organisation der Verdoppelung des Säugergenoms: Vergleich experimenteller Daten mit Erwartungswerten aus der statistischen Durchrechnung eines mathematischen Modells

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Arno Fraterman
aus Den Haag

1978

78 380

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0037

Modell für die Organisation der Verdoppelung des Säugergenoms: Vergleich experimenteller Daten mit Erwartungswerten aus der statistischen Durchrechnung eines mathematischen Modells

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Arno Fraterman
aus Den Haag

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 6. 1978

Dekan : Prof. Dr. W. Zeil

1. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Probst

2. Berichterstatter : Prof. Dr. U. Weber

Für meine Frau

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Probst für die Überlassung des Themas und für die ständige Betreuung meiner Arbeit. Ferner danke ich Herrn Dr. R. Wais, Rechenzentrum der Universität Hamburg, für die Formulierung und Programmierung des mathematischen Modells.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Zellmaterial	4
2.1.	Ehrlich-Ascites-Tumorzellen	4
2.2.	Escherichia Coli F165/λt68,c1857	4
3.	Reagenzien	5
3.1.	Kulturmedium für Ehrlich-Ascites-Zellen	5
3.2.	Kulturmedium für E.Coli	6
3.3.	Hanks-Lösung	6
3.4.	RNAase-Gemisch	6
3.5.	Toluolszintillator	7
3.6.	Phenol-Lösung pH 9	7
4.	Methoden	8
4.1.	Entnahme der Zellen	8
4.2.	Markierung mit radioaktiven Vorstufen	8
4.2.1.	Pulsmarkierung mit ^{3}H-Thymidin	8
4.2.2.	Pulse-Chase-Markierung	9
4.2.3.	Vormarkierung mit ^{14}C-Thymidin	9
4.3.	Selektion synchroner Zellpopulationen	10
4.4.	Anlage einer synchronen in vitro Kultur	11
4.5.	Isolierung der Ascites-DNA	11
4.6.	Herstellung der λ-DNA	12
4.6.1.	Selektion der temperatursensitiven Mutante	12
4.6.2.	Präparation der Phagen	12
4.6.3.	Isolierung der λ-DNA	14
4.7.	Verdauung der λ-DNA mit Restrictions-endonuclease Eco RI	14
4.8.	Fragmentierung der Ascites-DNA	15
4.9.	Filterbindungstest	15
4.10.	Zonenzentrifugation	16
4.11.	Analytische Ultrazentrifugation	16

Seite

4.12. Chromatographie an Sepharose IV B 17

4.13. Radioaktivitätsmessungen 18

4.13.1. Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität in gelöster DNA 18

4.13.2. Bestimmung der Radioaktivität im Filterbindungstest 18

4.13.3. Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität in ganzen Zellen 19

4.14. DNAase II Verdauung 19

4.15. Bestimmung des Thymidin-Markierungsindex durch Autoradiographie 20

5. Modell zur DNA-Replikation 21

6. Ergebnisse und Diskussion 25

6.1. Vorbemerkungen 25

6.2. Eichung des neutralen Rohrzuckergradienten 25

6.3. Molekulargewichtsverteilung kryolysierter DNA-Proben 28

6.3.1. Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung mit der analytischen Ultrazentrifuge 28

6.3.2. Bestimmung der Größe der kleinsten Kryolysefragmente 33

6.3.2.1. Eichung der Sepharosesäule mit DNAase II-Fragmenten 33

6.3.2.2. Größenbestimmung der kleinsten Kryolysefragmente 35

6.3.3. Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung durch Rohrzucker-Gradientenzentrifugation 40

6.4. Berechnung der Korrekturfaktoren für zusätzlich in die S-Phase eintretende Zellen 44

6.4.1. Korrektur über zellkinetische Daten 44

6.4.2. Experimentelle Bestimmung der Korrekturfaktoren 45

6.5. Bestimmung der experimentellen Streuung bei der Ermittlung der Nitrocellulose-bindenden DNA-Radioaktivitäts-Fraktionen 50

Seite

6.6. Kinetik der Nitrocellulosebindung radioaktiv markierter DNA bei "Pulse-Chase"-Experimenten 52

6.6.1. "Pulse-Chase"-Experiment mit asynchronen Zellen. Vergleich von Erwartungswerten aus der Modellrechnung mit experimentellen Daten 52

6.6.2. "Pulse-Chase"-Experiment mit synchronen Zellen 56

7. Zusammenfassung 60

Literaturverzeichnis 62

In dieser Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure, Di-Na-Salz
TBS	"Tris Buffered Saline"
TCA	Trichloressigsäure
PPO	2,5-Diphenyloxazol
POPOP	2,2'-p-Phenylen-bis-(5-Phenyloxazol)
Upm	Umdrehungen pro Minute
Ipm	Impulse pro Minute
Zpm	Zerfälle pro Minute

Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer:

0,1 M TBS : 0,1 M NaCl, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 6,75

0,4 M TBS : 0,4 M NaCl, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 6,75

Citratpuffer: 0,14 M NaCl, 0,05 M Na_3-Citrat

Puffer C : 10 mM NaCl, 50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8

1. Einleitung

Die bisher entwickelten Modellvorstellungen über den Ablauf der DNA-Replikation (1-5) gehen davon aus, daß nach lokaler Aufwindung der Doppelhelix die Tochterhelices bidirektional wachsen (6). Da die alle bisher bekannten DNA-Polymerasen nur in 5'→3'-Richtung synthetisieren können und eine freie 3'-OH-Gruppe (sog. "primer"-Ende) benötigen, ist zumindest für den Parentalstrang mit der falschen Polarität ein diskontinuierliches Wachstum zu fordern. Die dabei entstehenden kleinen DNA-Fragmente konnten erstmals von OKAZAKI et al. (7) in E.coli nachgewiesen werden (OKAZAKI-Stücke). Als Primer für die OKAZAKI-Stücke sollen dabei nach den derzeitigen Vorstellungen ganz allgemein kurze RNA-Sequenzen dienen (8-11). Nach dem heutigen Wissensstand gilt das diskontinuierliche Wachstum der DNA zumindest in einem Strang auch für Eukaryonten als gesichert (12-14).
Eine schematische Darstellung dieser Vorstellungen über die DNA-Replikation ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

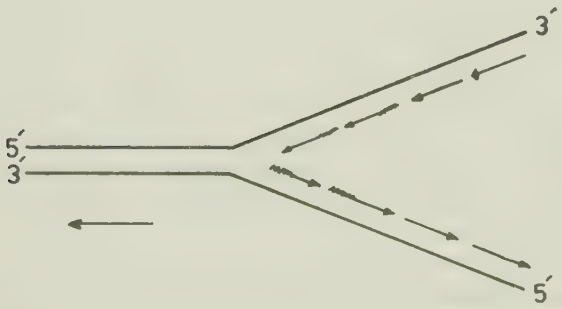

Abb. 1: Schematische Darstellung einer Replikationsgabel. Der Pfeil gibt die Richtung der Gabelbewegung an.
—— = DNA ~~~ = RNA

Charakteristisch für replizierende DNA ist, wie auch aus Abbildung 1 ersichtlich, das Vorhandensein kleiner Einstrangbereiche, sog. "gaps" im Bereich der Replikationsgabel. Diese Einstrangbereiche sind die Ursache für die Bindung der replizierenden DNA-Bereiche an Nitrocellulose bei hohen Ionenstärken und neutralem pH (12, 15-19).

Darüberhinaus scheint es in frisch replizierter DNA noch Bindungsstellen für Nitrocellulose zu geben, die nicht von einer arbeitenden Replikationsgabel verursacht werden. Diese Bindungsstellen scheinen jedoch mit dem Replikationsprozeß in einem engen Zusammenhang zu stehen.

Kinetische Untersuchungen über das Verhalten eines radioaktiven Markers in der DNA sich vermehrender Zellen (20, 21) und Experimente mit Hilfe der DNA-Faser-Autoradiographie (40) sprechen dafür, daß sich diese Bindungsstellen an den Punkten der DNA befinden, die der Grenze zwischen zwei benachbarten Replikationseinheiten ("Replikons") entsprechen. Man nimmt an, daß die Integration der einzelnen Replikationseinheiten in die fertige ("chromosome-sized") Tochter-DNA ein selbständiger, von der DNA-Replikation an der Gabel klar zu unterscheidender Prozeß ist (22). Die hier zugrundegelegte Hypothese geht davon aus, daß die Nitrocellulosebindungsstellen an den Replikongrenzen solange bestehen bleiben, bis dieser Prozeß abgeschlossen ist. Unter dem Begriff "Replikon" wird hier ein DNA-Abschnitt verstanden, der nach der Initiation durch zwei vom Initiationspunkt ausgehenden Replikationsgabeln in einem Zug durchrepliziert wird.

In Voruntersuchungen (20,23) zeigte sich, daß es möglich ist, Voraussagen über das kinetische Verhalten des an Nitrocellulose bindenden Anteils eines radioaktiven Markers in der DNA sich vermehrender Zellen zu machen. Grundlage für solche Voraussagen sind bestimmte mathematische Modelle, die den Ablauf der Replikation innerhalb einzelner Re-

plikons und deren Integration in das Gesamtgenom beschreiben. Mit statistischen Methoden lassen sich die entsprechenden Voraussagen für das kinetische Verhalten der Bindung eines radioaktiv markierten Markers an Nitrocellulose in der DNA ableiten.
Dabei ergaben Fehlerbetrachtungen, daß solche Modellrechnungen nur dann sinnvoll sind, wenn die für die statistischen Durchrechnungen angenommenen Verteilungen der Kettenlängen der untersuchten DNA-Proben exakt den tatsächlich vorliegenden Verteilungen entsprechen.

Ziel dieser Arbeit war es, die experimentelle Nachprüfung solcher Modelle auf eine möglichst exakte Grundlage zu stellen. Dies beinhaltete vor allem die Auswahl eines geeigneten Fragmentierungsprinzips für die DNA der zu untersuchenden Proben und die Suche nach einem möglichst einfachen Weg, umfassende Informationen über die jeweils erzeugten Molekulargewichtsverteilungen zu erhalten.
Nach Erarbeitung dieser Grundlagen sollte mit den Daten eines repräsentativen Experiments an einem vorläufigen mathematischen Modell ein solcher Vergleich praktisch durchgeführt werden. Dabei kam es vor allem auf eine möglichst exakte Definition der experimentellen Randbedingungen und deren Berücksichtigung bei der statistischen Durchrechnung, weniger auf den Einsatz eines möglichst ausgefeilten mathematischen Modells an. Aus den Ergebnissen sollte vielmehr beurteilt werden, wie detailliert ein solches Modell überhaupt sinnvollerweise noch sein kann, um mit der erreichten experimentellen Genauigkeit nachprüfbar zu sein.

Darüberhinaus sollten in dieser Arbeit Hinweise über die Organisation der Replikation im Verlaufe der S-Phase erarbeitet werden, die ihrerseits wieder als Grundlage für die Einbeziehung solcher Organisationsstrukturen in ein Computer-Modell dienen können. Zur Realisierung dieses Teils des Vorhabens war der Einsatz synchroner Zellpopulationen notwendig.

2. Zellmaterial

2.1. Ehrlich-Ascites-Tumorzellen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Ehrlich-Ascites-Tumorzellen handelt es sich um einen sowohl in vivo als auch permanent in vitro züchtbaren Stamm (24,25).
Die biologischen Eigenschaften der Zellen sind ausführlich in (26) beschrieben. Ihre Haltung als Ascitestumor erfolgt auf weiblichen NMRI-HAN-Mäusen von 20-25 g (Züchtung: Zentral-Institut für Versuchstiere, Hannover).
Zur Inokulation werden 0,2 ml (ca. 25 x 10^6 Zellen) eines etwa 7 Tage alten Ascites in die Bauchhöhle gesunder Mäuse überimpft.
Für die Experimente wurde durchweg Zellmaterial verwendet, das 4 Tage nach der Inokulation entnommen wurde. Der Tag des Überimpfens zählt als nullter Tag. Zum Zeitpunkt der Entnahme befinden sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase (26).

2.2. Escherichia Coli F165/λ t 68,c1857

Zur Eichung der Molekulargewichtsbestimmung wurde die DNA eines λ-Phagens verwendet, der in das Genom des o.g. E.Coli Stammes integriert ist. Der Stamm wurde mir freundlicherweise von Prof. Dr. P. Starlinger, Institut für Genetik der Universität Köln, überlassen.

3. Reagenzien

3.1. Kulturmedium für Ehrlich-Ascites-Zellen

Die Haltung der Ascites-Tumorzellen erfolgt in einem Kulturmedium nach Schindler (25) mit folgender Zusammensetzung:

15 % Pferdeserum

Salze (in g/l):

NaCl	8,0	$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,20	KH_2PO_4	0,060
KCl	0,4	$NaH_2PO_4 \times H_2O$	0,05	$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,272

Aminosäuren (in mMol/l):

L-Arg.HCl	0,10	L-Ile	0,20	L-Lys	0,02
L-His.HCl	0,05	L-Val	0,20	L-Phe	0,10
L-Cys-Cys	0,05	L-Met	0,05	L-Leu	0,20
L-Glu.NH_2	0,02	L-Thr	0,20	L-Try	0,02
L-Tyr	0,10				

Vitamine u.a. (in mg/l):

Biotin	0,01	Ca-Panthothenat	0,5
Cholin.HCl	1,50	Folsäure	10,0
i-Inosit	1,50	Nicotinamid	0,5
Pyridoxal.HCl	0,50	Riboflavin	0,5
Penicillin G	30,00	Streptomycinsulfat	30,0

Die Herstellung des Kulturmediums wird ausführlich in (27) beschrieben.

3.2. Kulturmedium für E.Coli

Für die Kultur der E.Coli-Bakterien wurde ein Vollmedium folgender Zusammensetzung verwendet:

NaCl	5 g
Bacto-Trypton (Difco)	16 g
Hefe-Extrakt (Difco)	10 g
Leitungswasser ad 1 l.	

3.3. Hanks-Lösung (24)

NaCl	8,0 g/l	KH_2PO_4	0,06 g/l
KCl	0,4 g/l	Glucose	1,0 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g/l	$NaHCO_3$	0,3 g/l
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0,06 g/l	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,18 g/l

Das $CaCl_2$ muß als letzte Substanz zugegeben werden.

3.4. RNAase-Gemisch

Pancreatische RNAase (EC 3.1.4.22 Serva, Heidelberg, 45 Kunitz-Einheiten, lyophylisiert, 1 mg/ml in H_2O dest.) wurde 3 x 10 Min. auf 80°C zur Denaturierung von DNAasen erhitzt und auf Trockeneis eingefroren. Anschließend wurden ca. 10000 Einheiten T1 RNAase aus Aspergillus oryzae (EC 3.1.4.8, Merck, Darmstadt) pro ml zugegeben.

3.5. Toluolszintillator

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde ein Toluolszintillator folgender Zusammensetzung benützt:
PPO 5,0 g
POPOP 0,3 g
wurden mit destilliertem Toluol auf 1000 ml aufgefüllt.
Zur Bestimmung der Radioaktivität flüssiger Proben wurde zum Toluolszintillator Triton X-100 im Verhältnis 70:30 zugesetzt.
Alle Proben wurden im liquid-scintillation-counter Typ 2450 der Fa. Packard Instruments, USA, gemessen.

3.6. Phenol-Lösung pH 9

Zur DNA-Isolierung wurde Phenol pH 9 nach PAOLETTI et al. (28) verwendet. Dazu wurde frisch destilliertes Phenol mit 1/9 Vol. 10^{-3} M EDTA-Lösung versetzt und mit 12 M KOH auf pH 9 eingestellt.

4. Methoden

4.1. Entnahme der Zellen

Zur Entnahme der Zellen wurde die Maus durch Genickbruch getötet. Nach Injektion von 1-2 ml Kulturmedium (37°C), das 5 USP-Einheiten Heparin (Liquemin R, Roche) pro ml enthielt, wurde die Ascitesflüssigkeit mit einer Einmalspritze abgezogen.

4.2. Markierung mit radioaktiven Vorstufen

Bei allen Markierungsversuchen wurden die verwendeten Lösungen vor Kontakt mit den Zellen auf 37°C vorgewärmt. Die Inkubationen wurden in einem thermostatisierten Wasserbad bei 37°C durchgeführt.

4.2.1. Pulsmarkierung mit ^{3}H-Thymidin

Für sehr kurze Pulszeiten (bis 2 Min.) wurden die Zellen in ein Reagenzglas überführt, das lediglich isotones (0,9 % an NaCl) ^{3}H-Thymidin (Methyl-^{3}H-Thymidin, The Radiochemical Centre, Amersham Buchler oder Nen Chemicals GmbH, spezif. Aktivität 50-60 Ci/mMol) enthielt.
Für die kinetischen Experimente wurden 100 µCi pro ml Zellsuspension vorgelegt. Bei Pulszeiten größer als 2 Min. wurde die Markierung in Kulturmedium vorgenommen, das 10 oder 20 µCi/ml ^{3}H-Thymidin und zusätzlich 10^{-6} M unmarkiertes Thymidin enthielt. Die Zelldichte betrug hier 7 x 10^{5} Zellen/ml. Nach Ablauf der gewünschten Pulszeit wurde der Einbau von Radioaktivität durch Überführen des Inkubationsansatzes in eine Mischung aus Hanks-Lösung und gefrorener Hanks-Lösung gestoppt. Anschließend wurden die Zellen zur

Entfernung der nicht aufgenommenen Radioaktivität 3 mal mit Hanks-Lösung in der Kälte durch Zentrifugation und Resuspendierung gewaschen.

4.2.2. Puls-Chase-Markierung

Nach einem Puls nach 4.2.1. wurden die Zellen in das 100-fache Volumen Kulturmedium überführt, das 10^{-5} M nichtmarkiertes Thymidin enthielt und für die gewünschte Zeit weiterinkubiert. Um Temperatureinflüsse bei der Überführung zu verhindern, wurde die Inkubation in einem auf 37°C erwärmten Raum durchgeführt. Das Stoppen des Einbaus erfolgte nach 4.2.1.

4.2.3. Vormarkierung mit ^{14}C-Thymidin

Um für die kinetischen Experimente eine Bezugsgröße zu haben, wurde die DNA in vivo markiert. Der Maus wurden 10 µCi ^{14}C-Thymidin (The Radiochemical Centre, Amersham Buchler, spez. Aktivität 60 Ci/mMol) in steriler isotonischer Kochsalzlösung auf 2 mal verteilt 12 Stunden und 5 Stunden vor der Zellentnahme injiziert. Da sich die ^{14}C-Markierung zum Zeitpunkt der Entnahme der Ascites-Zellen genügend weit vom Replikationspunkt entfernt befindet, kann das Verhalten der ^{14}C-markierten DNA der allgemeinen Zell-DNA gleichgesetzt werden.

4.3. Selektion synchroner Zellpopulationen

Durch Zentrifugation in einem Rohrzuckergradienten von 2-31 % Sucrose (2 % Sucrose (w/v) in Hanks-Lösung, die nur 7,6 g NaCl/l enthält und 31 % Sucrose (w/v) in Hanks-Lösung ohne NaCl) wurden die Zellen entsprechend ihrer Größe, die im Verlauf des Zellzyklus von der G1-Phase über die S-Phase bis zur G2-Phase zunimmt, aufgetrennt. Die Zentrifugation wurde im Zonal-Rotor Typ A der MSE Mistral 6E Zentrifuge bei 4°C durchgeführt.
Der leicht konkave Gradient wurde bei 300-400 rpm aufgebaut. Die aus der Maus entnommenen Zellen wurden in Hanks-Lösung gewaschen und in 18-20 ml Hanks-Lösung mit 1 % Rohrzucker suspendiert. Innerhalb von einer Minute wurde die Zellsuspension bei ca. 300 rpm aufgetragen und mit 30 ml Hanks-Lösung überschichtet. Anschließend wurde 8 Min. bei 900 rpm zentrifugiert, Danach wurde die Umdrehungszahl auf ca. 280 rpm gesenkt, der Rotor jedoch nicht gebremst.
Zur Fraktionierung wurde der Gradient durch Unterschichten mit 31 % Sucrose (s.o.) bei 50 ml/Min. verdrängt und zur kontinuierlichen Trübungsmessung bei 578 nm durch eine Durchflußküvette zum ISCO UV-Monitor 5 geleitet. Es wurden Fraktionen zu 12 ml aufgefangen.
Sollten die Zellen nach der Zentrifugation zur Anlage einer in vitro Zellkultur verwendet werden, so wurde die Zonalzentrifugation mit Lösungen durchgeführt, die Streptomycin (30,0 mg/l) und Penicillin G (30,0 mg/l) enthielten.

Die genaue Dokumentation des angewandten Verfahrens ist in Ref. (26) und (27) beschrieben.

4.4. Anlage einer synchronen in vitro Kultur

Die selektierten Zellen wurden zur Entfernung des Rohrzukkers in 200 ml kalte Hanks-Lösung aufgenommen, abzentrifugiert (5 Min., 500 g) und nach Entfernung des Überstandes mit der gewünschten Zelldichte in frisches Medium suspendiert.
Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop bestimmt.

4.5. Isolierung der Ascites-DNA

Die DNA-Präparation erfolgte nach (21) und (51).
Die gewaschenen Zellen (ca. 30 x 10^6) wurden in 5 ml Citratpuffer suspendiert und 1 sec. mit dem Ultra-Turrax TP18/2 (Janke & Künkel, Freiburg i.Br.) in der Kälte homogenisiert. Der Ultra-Turrax wurde noch 2 mal mit je 5 ml Citratpuffer gewaschen und die Waschflüssigkeit mit dem Homogenisat vereinigt. Das rohe Chromatin wurde 20 Min. bei 10000 g zentrifugiert. Nach Resuspendierung in 5 ml Citratpuffer wurde noch einmal wie oben verfahren.
Nach der zweiten Zentrifugation wurde in 4 ml Citratpuffer resuspendiert, 1 sec. homogenisiert, mit 4 ml Citratpuffer nachgewaschen und in ein 10 ml Zentrifugenglas überführt. Nach der Zentrifugation wurde das Chromatin in 1 ml Citratpuffer resuspendiert, 1 sec mit dem Ultra-Turrax TP18/10 homogenisiert und mit 1 ml nachgewaschen.
Das Homogenat (2 ml) wurde mit 0,7 ml "Phenol pH 9" (s. 3.6.) versetzt und eine Stunde zur Denaturierung der Proteine mit ca. 20 Upm an einem Rührmotor gedreht.
Zur Phasentrennung wurde die Probe 10 Min. im Rotor SW 50.1 bei 23000 Upm (50000 g) in Nitrozellulose-Röhrchen zentrifugiert. Die phenolische Phase wurde nach dem Anstechen des Röhrchens abgetropft.
Die wässrige Phase wurde zusammen mit der Interphase unter

4-maligem Wechsel gegen Puffer C dialysiert.
Nach der Dialyse wurde 1 Stunde mit RNAase-Gemisch (s. 3.4.) verdaut. Nach Zugabe von SDS ad 0,5 % wurde 100 mg/ml Proteinase K (Merck, Darmstadt, 20 m AnsonE/mg) zugesetzt. Das Enzym wurde vor der Zugabe 1 Stunde bei 37°C vorinkubiert. Nach der Verdauung wurde 1 ml "Phenol pH 9" zugegeben, 30 Min. am Rührmotor mit 20 Upm gedreht und zur Phasentrennung im Rotor SW 50.1 zentrifugiert. Eine dritte Phenolisierung wurde angeschlossen.
Nach der dritten Phenolextraktion wurde unter 2-maligem Wechsel gegen 0,1 M TBS und anschließend unter 2-maligem Wechsel gegen 0,4 M TBS dialysiert.

4.6. Herstellung der λ-DNA

4.6.1. Selektion der temperatursensitiven Mutante

Aus der Stammkultur wurden Einzelkulturen auf Agar-Platten selektiert. Diese Einzelkolonien wurden anschließend in steriles Kulturmedium (s. 3.2.) aufgenommen und geteilt. Es wurden die Kolonien selektiert, die bei 20°C anwuchsen und bei 42°C kein Wachstum zeigten.

4.6.2. Präparation der λ-Phagen

In einem 10 l Schikanekolben wurden 4 l Medium mit den temperatursensitiven E.Coli-Zellen so angeimpft, daß die Extinktion bei 550 nm etwa 0,05 betrug. Unter guter Belüftung wurde die Kultur bei 20°C bis zu einer Extinktion von 0,12-0,15 wachsen lassen. Dann wurde die Kultur so schnell wie möglich auf 42°C aufgeheizt, ^{14}C-Thymidin (0,01 µCi/ml) zugegeben und 5-10 Min. bei der permissiven Temperatur unter

guter Belüftung belassen. Nach dieser Zeit wurde die Temperatur auf 37°C gesenkt und die Bakterien bis E^{1cm}_{550nm} etwa 0,5 betrug (= 5,1 x 10^8 Bakterien/ml) wachsen lassen. Die Bakterien wurden anschließend abzentrifugiert und in 5 ml Phagenpuffer (0,01 M Tris·HCl, pH 7,3, 2 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 4 g NaCl/l) pro Gramm Bakterien resuspendiert. Zur Bakteriensuspension wurden 1/5 Volumen Chloroform p.a. zugegeben und 5 Min. bei 37°C unter vorsichtigem Rühren inkubiert. Anschließend wurde die hochvisköse Lösung mit 0,5 mg/ml DNAase I (aus Rinderpancreas, EC 3.1.4.5, Boehringer Mannheim, spez. Akt. 1000 E/mg) versetzt und weitere 5 Min. inkubiert. Nach der Inkubation wurde 15 Min. bei 10000 g zur Entfernung der Zelltrümmer zentrifugiert.

Der opaleszierende Überstand wurde im Rotor SW 27 in einem CsCl-Stufengradienten mit Stufen aus je 5 ml CsCl-Lösung der Dichten 1,29 g/cm^3, 1,46 g/cm^3, 1,55 g/cm^3 und 1,74 g/cm^3 2 Stunden bei 22000 rpm zentrifugiert. Die Röhrchen wurden angestochen und die opaleszierende Phagenbande aufgefangen. Die vorgereinigte Phagensuspension wurde anschließend mit CsCl bis zur Dichte 1,5 g/cm^3 versetzt und im Rotor 50 ti 36 Stunden bei 27000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient in 0,5 ml Fraktionen fraktioniert. Die opaleszierenden phagenhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und zur Vermeidung eines osmotischen Schocks vor der Dialyse mit konzentrierter CsCl-Lösung bis E^{1cm}_{260nm} = 13 verdünnt. Anschließend wurde unter häufigem Wechsel gegen 10 mM Tris·HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl dialysiert.

4.6.3. Isolierung der λ-DNA

Die Isolierung der λ-DNA erfolgte nach (29).
Die dialysierten Phagen wurden in 10 mM Tris·HCl, pH 7,5, 10 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0,5 % SDS und 50 µg/ml Proteinase K lysiert. Nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C unter gelegentlichem, vorsichtigem Bewegen, wurde das Lysat 2 mal unter Vermeidung von Scherkräften mit Phenol extrahiert.
Das frisch destillierte Phenol wurde vor der Phenolextraktion mit 1 M Tris·HCl pH 8,0 gesättigt.
Zur Phasentrennung wurde 20 Min. bei 10000 g zentrifugiert. Die vereinigten Phenolphasen wurden mit 0,1 M Tris·HCl pH 8,0 extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereint und unter häufigem Wechsel gegen 10 mM Tris·HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA dialysiert.

4.7. Verdauung der λ-DNA mit Restrictionsendonuclease Eco RI

Zur Verdauung mit Restrictionsendonuclease Eco RI (10000 E/ml, Boehringer, Mannheim) wurde die λ-DNA gegen den Inkubationspuffer (0,1 M Tris·HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$) dialysiert.
Das Enzym wurde vor der Inkubation mit Verdünnungspuffer (10 mM K-PO_4 pH 7,0, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,7 mM Mercaptoäthanol, 2 mg/ml Rinderserumalbumin, 0,2 % Triton (v/v)) 1:30 - 1:70 verdünnt.
Im Inkubationsansatz wurde 25 µg λ-DNA mit 125 µl verdünnter Enzymlösung im Inkubationspuffer in einem Gesamtvolumen von 1,25 ml 60 Min. bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von EDTA wurde die Reaktion gestoppt.

4.8. Fragmentierung der Ascites-DNA

Die gegen 0,4 M TBS dialysierte DNA wurde nach LYSCOV und MOSHKOVSKY (30) kryolysiert. Dazu wurde die DNA in einem Kolben mit möglichst exakt planem Boden so überführt, daß die Schichtdicke 0,7 mm nicht überschreitet. Die maximal verwendete Konzentration sollte nicht größer als 50 µg/ml sein (23).
Der Kolben wurde dann abwechselnd in flüssige Luft (-180°C) und in ein Wasserbad der Temperatur 35-40°C getaucht. Die Gefrierzeit betrug zwischen 1 und 1,2 Min. Die Auftauzeit wurde so gewählt, daß der Kolben gerade vollständig aufgetaut war. Sie betrug in der Regel zwischen 1,5 und 2,3 Min.
Die Anzahl der Kryolysezyklen betrug 80.
Eine zu diesem Zweck konstruierte Apparatur gestattet es, bis zu 7 Proben gleichzeitig und weitgehend unbeaufsichtigt zu kryolysieren.

4.9. Filterbindungstest

Mit dem Filterbindungstest wurde der Anteil des an Nitrocellulose-Membranfilter bindenden Anteils radioaktiv markierter DNA bestimmt. Der Test wurde nach STUMPF (23) an einer Absaugapparatur durchgeführt, die es gestattet, bis zu 20 Proben gleichzeitig unter kontrolliertem Unterdruck abzusaugen. Es wurden Membranfilter der Fa. Sartorius vom Typ SM 11308, Porengröße 0,15 µm verwendet.
Vor Benützung wurden die Filter 1 Stunde in 0,4 M TBS eingeweicht. Die eingestellte Durchflußrate betrug 1 ml/Min. Nach Durchlaufen von 1 ml 0,4 M TBS wurde die in 0,4 M TBS gelöste DNA aufgetragen und mit 10 ml 0,4 M TBS nachgewaschen. Die am Filter gebundene Radioaktivität wurde nach 4.13.2. bestimmt.

4.10. Zonensedimentation im Rohrzuckergradienten

Grundpuffer für die neutrale Rohrzucker-Gradientenzentrifugation war 10 mM Tris·HCl pH 7,8, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA. Die Zentrifugation wurde im Rotor SW 40 Ti in den Zentrifugen L2-65B und L5-75 der Fa. Beckman bei 39000 rpm und 5°C in einem linearen Rohrzuckergradienten von 5-30 % Rohrzucker durchgeführt. Der Gradient wurde am ISCO gradientformer model 570 aufgebaut. Vor dem Aufbau des Gradienten wurde 0,5 ml 30 %ige Rohrzuckerlösung vorgelegt. Das Gradientenvolumen betrug 12,5 ml, das Auftragsvolumen 0,5 ml. Fraktioniert wurden die Gradienten mit dem ISCO gradientfractionator model 640 durch Unterschichten mit 50 %iger Rohrzuckerlösung, wenn nicht anders beschrieben, in 0,4 ml Fraktionen.

4.11. Analytische Ultrazentrifugation

Die Messungen wurden an einem prep.UV.scanner mit Multiplexer der Fa. Beckman an der Ultrazentrifuge L5-75 durchgeführt. Der Scanner wurde zur Verbesserung der optischen Eigenschaften mit einer stärkeren UV-Lampe und einem Gittermonochromator Typ GM 1139 versehen.
Um die Auswertung der Daten am Computer zu erleichtern, wurde paralell zum Kompensationsschreiber ein Interface mit AD-Wandler und Halbleiterspeicher zur Ausgabe der Daten auf eine Facit-Stanze Typ 4070 angeschlossen. Die Datenübergabe vom Scanner an das Interface erfolgte alle 0,045 sec.
Die DNA-Proben wurden bei einer Konzentration von ca. 25 µg/ml in Zellen mit Doppelsektormittelstück (12 mm Kel-F) zentrifugiert. Die Auswertung der Scans erfolgte durch Bestimmung der optischen Dichte (als mm Ordinatenwert) vom Meniskus bis in den Plateaubereich im Abstand von 0,011 mm. Die Daten wurden numerisch differenziert und nach (31) für

Monochromatorfehler, radiale Verdünnungseffekte auf Grund der sektorförmigen Zelle und auf effektive Zentrifugationszeit korrigiert.
Aus den korrigierten Werten wurde die integrale und differentielle Verteilung der Sedimentationskoeffizienten nach einem modifizierten Verfahren nach ELIAS (32), das in Ref. 31 ausführlich beschrieben ist, berechnet. Die Sedimentationskoeffizienten wurden nach STUDIER (33) in Molekulargewichte umgerechnet. Das Verfahren beinhaltet eine Einteilung des gesamten sedimentierenden Materials in einer Anzahl von Klassen. Die Klassen wurden wie folgt definiert:
Es wurden Prozentzahlen p(1), p(2)....p(n+1) gewählt. Für jeden Prozentwert p(i) gilt, daß p(i) Prozent des gesamten sedimentierenden Materials den Sedimentationskoeffizienten c(i) besitzt. Die Klasse i enthält dann den Anteil des Materials zwischen den Sedimentationskoeffizienten c(i) und c(i+1), für i=1,...,n.
Die Berechnung erfolgte mit Hilfe eines FORTRAN-Programms auf einer TR440-Rechenanlage im Zentrum für Datenverarbeitung der Universität Tübingen.

4.12. Chromatographie an Sepharose IV B

Zur Chromatographie wurde eine Säule (1,6 x 100 cm) mit Kühlmantel und zwei Durchflußadaptoren (Pharmacia, Uppsala) verwendet.
Die Säule wurde mit dem dreifachen Säulenvolumen 0,1 SSC (0,15 M NaCl, 0,015 M Na_3-Citrat) equilibriert.
Die aufzutragende DNA wurde gegen diesen Puffer dialysiert. Das Ausschlußvolumen der Säule wurde durch Gelfiltration einer Probe Dextranblau 2000 (Pharmacia) durch Messung der Extinktion bei 650 nm bestimmt. Der erste Gipfel, der die hochmolekularen Anteile enthält, zeigt das Ausschlußvolumen an.

Die Charakterisierung der Säulenfraktionen erfolgte durch die Berechnung des K_{av}-Wertes.

4.13. Radioaktivitätsmessungen

4.13.1. Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität in gelöster DNA

Jeweils 1 ml DNA-Lösung wurde unter Eiskühlung mit 200 µl alkalischer Kalbsthymus-DNA (200 µg/ml 1,5 N KOH) als Carriersubstanz und anschließend mit TCA bis zu einem Überschuß an freier Säure von 5 % versetzt. Nach 30 Min. im Eisbad wurde der Niederschlag auf einem Membranfilter (Selectron-Membranfilter, Schleicher & Schüll, Typ BA90, 0,6 µm Porengröße) gesammelt und mit 1 %iger kalter TCA gewaschen. Nach dem Trocknen (10 Min., 80°C) wurde das Filter mit 5 ml Toluolszintillator versetzt und in einem Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometer ausgezählt.

4.13.2. Bestimmung der Radioaktivität im Filterbindungstest

a) Zur Bestimmung der säurefällbaren Gesamtradioaktivität wurde nach 4.13.1. verfahren, mit dem Unterschied, daß zur Vermeidung von Quencheffekten mit 0,2 ml 1,5 N KOH/ml DNA-Lösung versetzt wurde.

b) Die nach der Passage der DNA und Waschen mit 0,4 M TBS auf dem Filter verbliebene Radioaktivität wurde nach dem Trocknen des Filters mit 5 ml Toluolszintillator versetzt und ausgezählt.

4.13.3. Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität in ganzen Zellen

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde zentrifugiert und nach nochmaligem Waschen und Zentrifugieren wurde das Sediment unter Eiskühlung mit 0,5 ml H_2O dest. aufgenommen und mit 0,5 ml 0,2 N NaOH lysiert. Anschließend wurde mit TCA bis zu einem Überschuß an freier Säure von 5 % versetzt, nach 30 Min. (Eisbad) wurde der Niederschlag auf einem Glasfaserfilter (Whatman, GF/C) gesammelt. Nach dem Trocknen (10 Min., 80°C) wurde das Filter mit 0,5 ml Hyamine (Packard instruments) versetzt, über Nacht bei 37°C oder 1 Stunde bei 60°C inkubiert und nach Zugabe von 10 ml Toluolszintillator ausgezählt. Die Bestimmung der Zählausbeute erfolgte durch Zugabe von ^{14}C- bzw. ^{3}H-Toluol als innerem Standard.

4.14. DNAase II Verdauung

Nach 4.5. isolierte nicht radioaktiv markierte Ascites-DNA wurde gegen 0,15 M Na-Acetat-Puffer pH 5,4 dialysiert und anschließend mit 28 U DNAase II (Serva, Heidelberg, 200 Kunitz-Einheiten/mg) pro 50 µg DNA bei 25°C 5 Min. inkubiert. Die Verdauung wurde durch Zugabe von "Phenol pH 9" (3.6.) gestoppt.
Zur Entfernung des Proteins wurde 1 Stunde mit "Phenol pH 9" geschüttelt und anschließend gegen den Auftragspuffer für die Sepharosesäule (4.12.) dialysiert.

4.15. Bestimmung des Thymidin-Markierungsindex
Autoradiographie

Zur Bestimmung des Markierungsindex über einen Zeitraum von 6 Stunden wurden einer Maus Zellen entnommen und in Kulturmedium bei einer Konzentration von 700 000 Zellen/ml bei 37°C wachsen lassen.
Zu bestimmten Zeiten wurden der Kultur Aliquots von 1 ml entnommen und mit 8 µCi ^{3}H-Thymidin 10 Min. inkubiert. Die Inkubation wurde durch Eingießen in eiskalte Hanks-Lösung gestoppt.
Nach dem Stoppen wurden die Zellen noch 2 mal mit Hanks-Lösung gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurden die Zellen in 1 ml Hanks-Lösung aufgenommen, mit 2 ml Äthanol versetzt und im Kühlschrank bis zur Weiterverarbeitung stehen lassen. Dann wurden die Zellen 3 mal mit Methanol/Eisessig (3:1) gewaschen und anschließend in 200 µl Methanol/Eisessig aufgenommen.
75 µl wurden auf gelatinierte Objektträger aufgetragen. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger nach (34) mit Kodak G5-Emulsion beschichtet und 5 Tage exponiert.
Nach dem Exponieren wurden die Objektträger in Kodak D19-Entwickler 5 Min. entwickelt. Die Entwicklung wurde durch Eintauchen in ein Stoppbad (2 % Essigsäure, 30 sec.) unterbrochen. Anschließend wurde 10 Min. fixiert.
Nach dem Entwickeln und Fixieren wurden die Objektträger nach (35) einer Hämalaun-Färbung unterworfen.
Nach dem Trocknen kann der Markierungsindex durch Auszählen der markierten und der nicht-markierten Zellen bestimmt werden.

5. Modell zur DNA-Replikation

Nach den derzeitigen Vorstellungen über den Mechanismus der DNA-Replikation geht das hier verwendete Computermodell der Replikation in Eukaryonten davon aus, daß sich nach der Initiation Gabelstrukturen von dem Ort der Initiation entlang der Parental-Doppelhelix fortbewegen, die dabei semikonservativ dupliziert wird. Am Ende einer Replikationseinheit (Replikon) angekommen, dauert es eine gewisse Zeit bis die Verschmelzung der frisch-replizierten Helices mit denen des benachbarten Replikons abgeschlossen ist und die durchgehende Tochterhelix-DNA entsteht ("Wartezeit"). In Abbildung 2 ist dieser Ablauf schematisch wiedergegeben.

Wie in der Einleitung (s.1.) bereits ausgeführt wurde, binden die Gabelstrukturen isolierter replizierender DNA an Nitrocellulose. Dies betrifft nach dem hier zugrundegelegten Vorstellungen sowohl replizierende Gabeln ("laufende" Gabeln), als auch nicht replizierende Gabeln während der "Wartezeit" ("wartende" Gabeln).

Läßt man die Replikation in Gegenwart einer radioaktiven DNA-Vorstufe ablaufen, so wird die neugebildete Tochterstrang-DNA radioaktiv. Während der Zeit des Radioaktivitätsangebots hinterlassen alle "laufenden" Gabeln einen entsprechenden Abschnitt radioaktiver Tochter-DNA. Hört das Radioaktivitäts-Angebot auf ("Pulse-Chase"-Experiment), so entfernen sich zu diesem Zeitpunkt "laufende" Gabeln weiter vom radioaktiven Abschnitt. Gabeln, die zur Zeit des Radioaktivitäts-Angebots zu "wartenden" Gabeln wurden, verbleiben in der Nachbarschaft des radioaktiven Abschnitts, bis sie nach Ablauf der "Wartezeit" ihre Gabel-Eigenschaft und ihre Fähigkeit,nach Isolierung an Nitrocellulose zu binden, verlieren.

Wird die DNA wachsender Zellen nach einem beliebigen Markierungsschema radioaktiv markiert und dann zu beliebigen

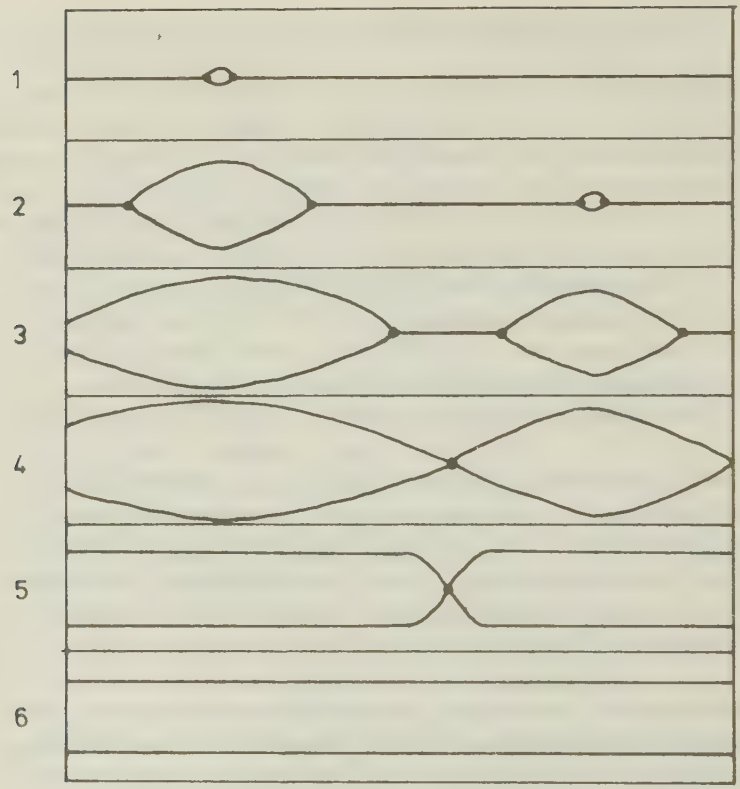

Abb. 2: Ablauf der Replikation in einem DNA-Abschnitt, der zwei benachbarte Replikations-Einheiten (Replikon) enthält:
1: Initiation des 1. Replikons
2: Initiation des 2. Replikons und Wachstum des 1. Replikons
3: Wachstum beider Replikons
4: Aufeinandertreffen der sich aufeinander zu bewegenden Gabeln der Replikons
5: Zustand während der "Wartezeit"
6: fertige DNA
In asynchronen Zellpopulationen liegen alle Zustände (und beliebige Zwischenzustände) gleichzeitig vor. Die Nitrocellulose-Bindungsstellen werden durch einen Punkt (≺ , ✕) symbolisiert.

Zeitpunkten nach Beginn der Markierung isoliert und in Fragmente zerlegt, so entstehen lineare (nicht bindende) und Gabeln-enthaltende (bindende) Fragmente, deren Radioaktivität durch ihre Vorgeschichte während des Markierungszeitraums bestimmt wird. Der an Nitrocellulose bindende Anteil der insgesamt in die DNA einer Zellpopulation während eines solchen Experiments eingebauten Radioaktivität ist unter der Voraussetzung, daß die beschriebenen Vorstellungen über den Ablauf der Replikation zutreffen, prinzipiell vorhersagbar. Er müßte abhängig sein von:

1. der Gabel-Bewegungs-Geschwindigkeit (hier Replikationsgeschwindigkeit)
2. der relativen Häufigkeit "wartender" Gabeln, d.h. von der Größe der Replikons und von der "Wartezeit"
3. dem Einbau der Radioaktivität in die DNA als Funktion der Zeit
4. den Fragment-Größen in der schließlich zur Messung der Nitrocellulose bindenden Radioaktivität eingesetzten DNA.

Die Größen der Fragmente werden bestimmt und als Verteilung der Länge der Kryolysefragmente eingegeben. Der Einbau der Radioaktivität in Abhängigkeit der Zeit wird gemessen und als "Einbaukurve" eingegeben.

Das Modell berechnet unter Beachtung der genannten Bedingungen aus den Eingabedaten theoretische Erwartungswerte für die Nitrocellulose-bindende Radioaktivität. Dazu wird mit Hilfe einer Optimierungsroutine die statistisch beste Anpassung der theoretischen Erwartungswerte an die experimentellen Daten gesucht. Dabei ergeben sich "Optimal"-Werte für folgende Parameter:

1. die (mittlere) Replikonlänge (µm)
2. die (mittlere) Replikationsgeschwindigkeit (µm/Min.)
3. die (mittlere) "Wartezeit" (Min.).

Für die mathematische Behandlung in dem vorläufigen, stark vereinfachenden Computer-Modell, wurden folgende Annahmen gemacht:

1. Die DNA ist in feste Replikons gleicher Länge eingeteilt.
2. Gabeln starten an Initiations-Stellen und halten am Ende des Replikons, wo sie bis zur Integration in die fertige Tochter-DNA "warten".
3. Die Replikationsgeschwindigkeit, d.h. die Gabelfortbewegungsgeschwindigkeit ist konstant.
4. Eine "laufende" Gabel bindet immer. Eine "wartende" Gabel bindet mit der Wahrscheinlichkeit

$$e^{\frac{-(t-t_h)}{\tau}} \qquad (t_h \leq t) \qquad (1)$$

wobei t der Meßzeitpunkt ist, t(h) der Zeitpunkt, zu dem die Gabel am Replikonende anhielt. τ ist eine "Relaxationszeit", die sog. "Wartezeit".
5. Die Verteilung der Fragmentlängen liegt vor (s.o.).
6. Die Fragmentlängen sind im Mittel so klein, daß mit hinreichender Näherung angenommen werden kann, daß "laufende" Gabeln nicht in gemeinsame Fragemente fallen.
7. Die Bruchwahrscheinlichkeit in der Nähe der Gabel ist nicht größer oder kleiner als an einer anderen Stelle des Moleküls. Insbesondere gibt es an der Gabel keine Sollbruchstellen.

6. Ergebnisse und Diskussion

6.1. Vorbemerkungen

Es war ursprünglich vorgesehen, für die Modellrechnungen die benötigten Molekulargewichtsverteilungen der durch Kryolyse nach LYSCOV und MOSHKOVSKY (3o) erzeugten Fragmente experimentell mit der analytischen Ultrazentrifuge zu ermitteln. Wie weiter unten ausgeführt wird, traten dabei erhebliche Schwierigkeiten auf, die es erforderlich machten, nach einer anderen Methode zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung zu suchen.
Da es sich bei der Kryolyse um einen Poisson-Prozeß handelt, sollten aus theoretischen Gründen die Molekulargewichte der erzeugten Fragmente exponential verteilt sein. Diese Verteilungen sind durch das dazugehörige, auf die Molekülzahl bezogene mittlere Molekulargewicht (M_n) vollständig definiert.
Dies bedeutet, daß hier statt der Ermittlung der ganzen Verteilung nur eine hinreichend exakte Bestimmung von M_n durchgeführt werden muß.
Im folgenden wird deshalb die in kryolysierten DNA-Proben vorliegende Molekulargewichtsverteilung nochmals einer exakten Analyse unterzogen und eine Methode erarbeitet und abgesichert, die zur Ermittlung aller benötigten Informationen mit der Rohrzucker-Gradientenzentrifugation auskommt.

6.2. Eichung des neutralen Rohrzucker-Gradienten

Um eine zuverlässige Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten zu ermöglichen, wurde der neutrale Rohrzuckergradient mit Hilfe von radioaktiv markierter λ-DNA geeicht. Dazu wurde λ-DNA nach 4.6. markiert, isoliert und nach

4.10. 3 h zentrifugiert. Abbildung 3 zeigt die Verteilung der Radioaktivität über dem Gradienten.
Nach (36) beträgt der Sedimentationskoeffizient von λ-DNA 33 S.

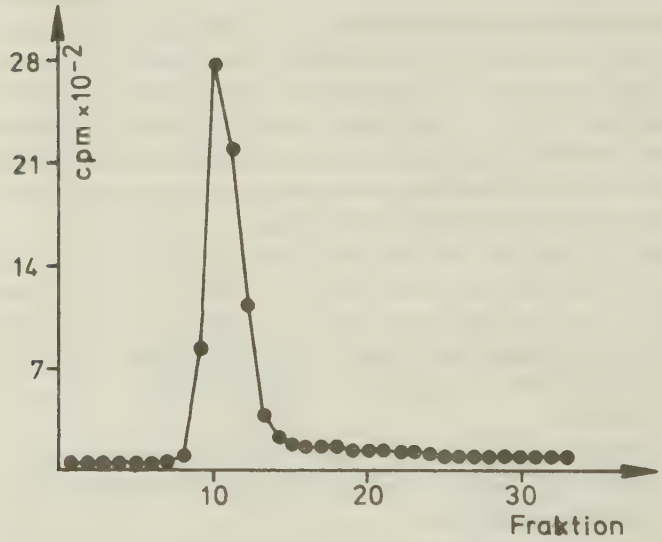

Abb. 3: Neutrale Rohrzuckergradientenzentrifugation der in 4.6. isolierten λ-DNA.
Bedingungen: 5-30 %, 39000 rpm, 3 h, Rotor SW40ti.

Um für die gewünschte längere Zentrifugationsdauer eine genauere Eichung zu erhalten, wurde die λ-DNA nach 4.7. mit Restrictionsendonuclease Eco RI verdaut. Nach der Verdauung wurde zur Entfernung des Enzyms eine Phenolisierung nach 4.6.3. angeschlossen. 0,5 ml der Fragmente wurden 10 h nach 4.10. zentrifugiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4 dargestellt.

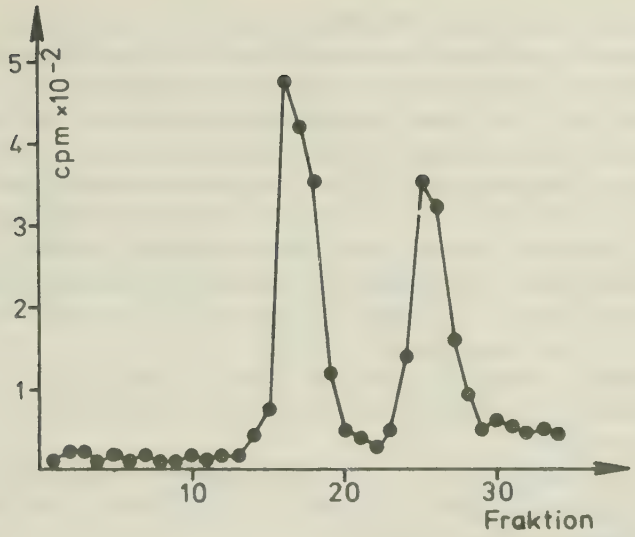

Abb. 4: Neutrale Rohrzucker-Gradientenzentrifugation von Eco-RI-Fragmenten von λ-DNA nach 4.7.
Rotor SW40ti, 5-30 %, 39000 rpm, 5°C, Laufzeit 10 h.

Restrictionsendonuclease Eco RI spaltet λ-DNA an 5 Stellen und erzeugt so 6 Fragemente, die nach (29) folgende Größe haben:

relative Länge	Mol.Gewicht x 10^{-6}	S-Wert
0,445	13,70	25,9
0,154	4,74	18,0
0,121	3,73	16,5
0,113	3,48	16,1
0,098	3,02	15,4
0,069	2,13	13,6

Tab. 1: Daten der durch Verdauung mit Eco RI erzeugten Fragmente.

Es wurden zwei Peaks erhalten.
Betrachtet man den prozentualen Anteil der Gesamtradioaktivität der beiden Peaks, so ergibt sich für Peak I 56,96 %, für Peak II 43,72 % der Gesamtradioaktivität.
Die kleineren Fragmente enthalten nach Tabelle 1 55 % des gesamten λ-Genoms. Das Ergebnis der Gradientenzentrifugation spricht dafür, daß sich die kleinen Fragmente (Peak I) nicht auftrennen lassen. Das größere Fragment läßt sich jedoch einwandfrei abtrennen. Die im Peak II gefundene Radioaktivität (43,7 % der Gesamtradioaktivität) entspricht gut der relativen Länge des Fragments.
Das größere Fragment wurde daher hier als Referenz für die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten in dieser Arbeit verwendet.
Die Berechnung der S-Werte erfolgte nach Normierung der Gradienten auf 34 Fraktionen durch Multiplikation der Fraktionsnummer mit dem Faktor:

$$1{,}07\ S \pm 0{,}03 \quad (n = 8).$$

6.3. Molekulargewichtsverteilung kryolysierter DNA-Proben

6.3.1. Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung mit der analytischen Ultrazentrifuge

Zur Längenbestimmung wurde nach 4.9. eine optisch reine DNA aus Ehrlich-Ascites-Zellen isoliert. Die DNA wurde nach 4.10. durch Kryolyse fragmentiert und mit 0,4 M TBS als Referenz nach 4.11. in der analytischen Ultrazentrifuge zentrifugiert.
Es wurden bei einer Rotorgeschwindigkeit von 24000 rpm (Rotor AN-D) 8 Scans automatisch im Abstand von 15 Min. aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte nach (31) wie in 4.11. beschrieben. Vor der eigentlichen Auswertung wurde

die digitalisierte Scannerkurve mit Hilfe eines Bibliotheksprogrammes des hiesigen Rechenzentrums ("spline") geglättet. Die dazu notwendige Bestimmung der Standardabweichung der Daten wurde vom Programm selbst aus Daten aus dem Plateau-Bereich errechnet. Die Sedimentationskoeffizienten wurden nach STUDIER (33) in Molekulargewichte umgerechnet.
Die erhaltene integrale Molekulargewichtsverteilung ist in Abbildung 5 wiedergegeben. Das Maximum der dazugehörigen

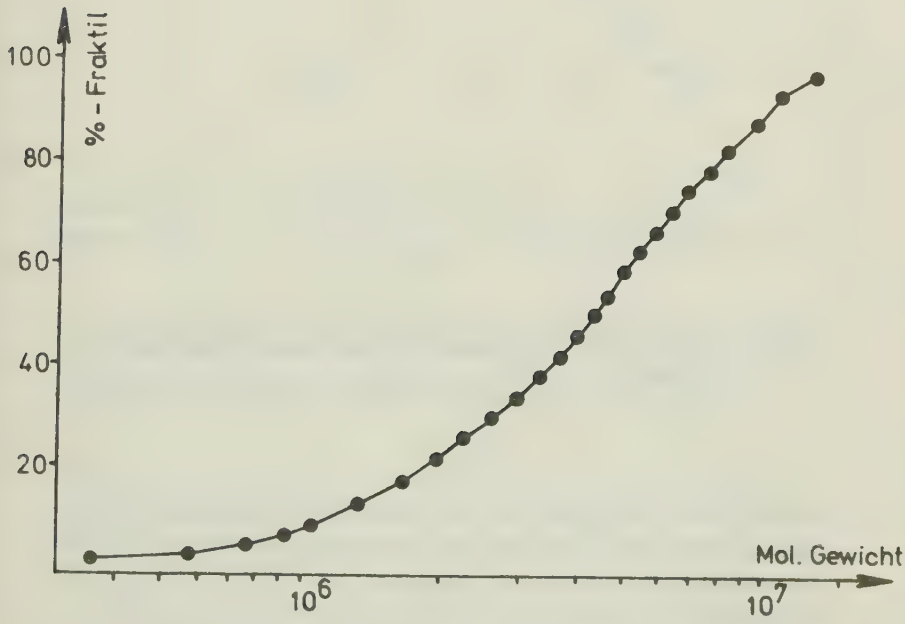

Abb. 5: Integrale Molekulargewichtsverteilung der DNA von Abbildung 6 bezogen auf die DNA-Masse (erfaßt als E_{260nm}).
Ordinate: Prozent der insgesamt gemessenen E_{260nm} unterhalb des angegebenen Molekulargewichts.

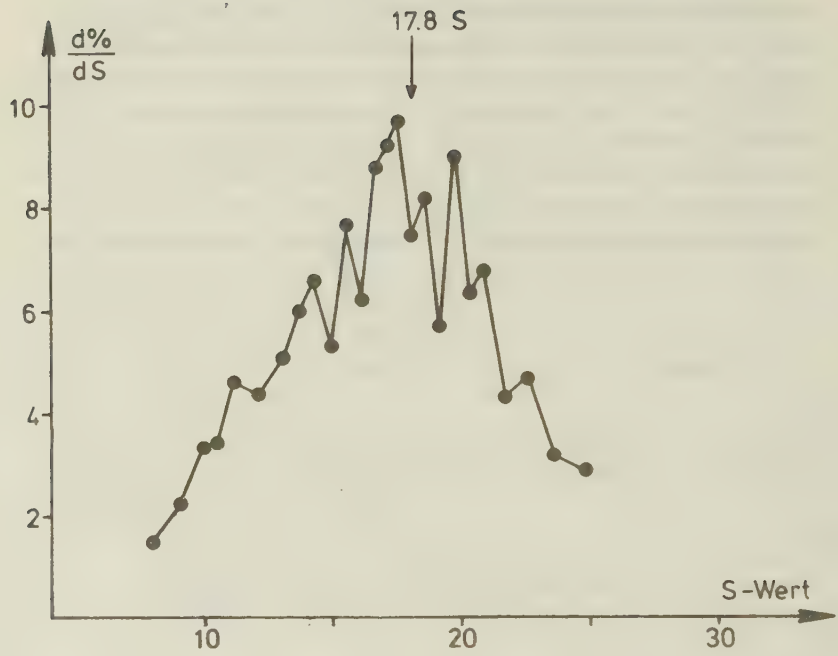

Abb. 6: Differentielle Verteilung der Sedimentationskoeffizienten kryolysierter DNA aus Ehrlich-Ascites-Zellen.
Analytische Ultrazentrifugation und Auswertung s. 4.11.

differentiellen Verteilung der Sedimentationskoeffizienten (Abbildung 6) liegt bei 17.8 S. Dies entspricht einem Molekulargewicht von $4{,}6 \times 10^6$ Dalton.
In Abbildung 7 wurde die Molekulargewichtsverteilung aus Abbildung 5 als Logarithmus der Anzahl der Moleküle pro Molekulargewichtsklasse ("Dichte") gegen das Molekulargewicht aufgetragen. Bei der Berechnung der Dichte wurde angenommen, daß alle Moleküle einer Gewichtsklasse das gleiche Molekulargewicht besitzen. Als Molekulargewicht der

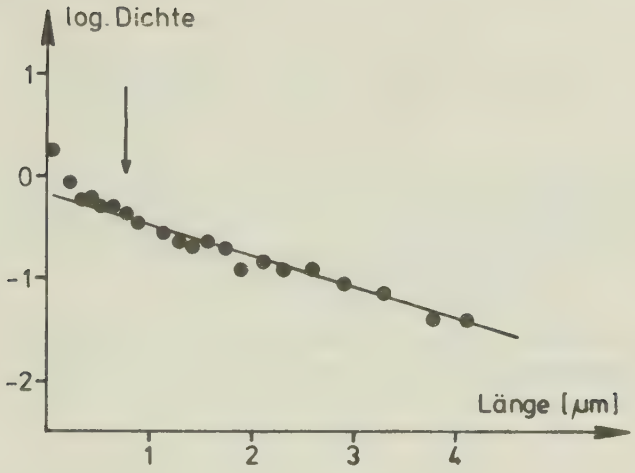

Abb. 7: Längenverteilung der kryolysierten DNA (dieselbe Probe wie Abbildung 5).
Der Pfeil gibt die berechnete mittlere Länge an.

Klasse wurde das arithmetische Mittel zwischen oberer und unterer Klassengrenze gewählt. Die Molekulargewichte wurden nach Gleichung 4 (siehe 6.3.3.) in Molekülläng en umgerechnet.

Nach der Literatur (30,37) handelt es sich bei der Kryolyse um einen Poisson-Prozeß. Dadurch muß es sich aus theoretischen Gründen bei der Größenverteilung der durch Kryolyse erzeugten Fragmente um eine Exponentialverteilung handeln.
Wie aus Abbildung 7 hervorgeht, ist die Exponentialverteilung im wesentlichen verwirklicht. Allerdings treten im Bereich kleiner Längen erhebliche Abweichungen auf.

Die Berechnung des für die Modellrechnung notwendigen M_n erfolgt aus dem bei den Messungen erhaltenen M_w, sodaß bei

Abweichungen im Bereich kleiner Längen die Masse der Moleküle stark ins Gewicht fällt. Die Folge davon ist, daß das M_n, errechnet aus den Daten der Abbildung 7, erheblich niedriger ausfällt, als aus dem Vergleich mit dem Wendepunkt der integralen Verteilung (Abbildung 5) zu erwarten wäre. Der Verdacht lag nahe, daß diese Abweichungen durch technische Unzulänglichkeiten bei der analytischen Ultrazentrifugation oder durch Fehler bei der zunächst angewandten manuellen Auswertung der Scannerkurven zustande kommen. Um die Abweichung im Bereich kleiner Längen zu verringern, wurden daher folgende Maßnahmen getroffen:

a) Es wurden apparative Veränderungen am Scanner zur Verbesserung der optischen Eigenschaften durchgeführt. Unter anderem wurde ein Gittermonochromator und eine stärkere Lampe eingebaut.

b) Zur Verbesserung der Auswertung wurde auf ein System zur Ausgabe der Daten auf Lochstreifen übergegangen, um so eine höhere Datenmenge verarbeiten zu können.

Beide Versuche, den Fehler zu beseitigen, schlugen fehl. Als letzte Erklärungsmöglichkeit verblieb, daß es sich wahrscheinlich um sehr langsam sedimentierende Verunreinigungen handelt, die bei der Aufarbeitung nicht beseitigt werden konnten.
Im folgenden wird deshalb der Bereich der kleinsten Kryolysefragmente nochmals gesondert untersucht.

6.3.2. Bestimmung der Größe der kleinsten Kryolyse-Fragmente

6.3.2.1. Eichung der Sepharosesäule mit DNAase II-Fragmenten

Zur Größenbestimmung der kleinsten Kryolysefragmente wurde eine Sepharosesäule nach 4.12. verwendet. Für die Eichung wurde Ascites-DNA nach 4.5. isoliert und mit DNAase II nach 4.14. verdaut. Das Ausschlußvolumen der Säule betrug 51 ml. Es wurden Fraktionen zu 1,5 ml aufgefangen.
Zur Charakterisierung der Säulenfraktionen wurde der K_{av}-Wert herangezogen. Er wurde nach Gleichung (2) berechnet:

$$K_{av} = \frac{V_s - V_O}{V_t - V_O} \qquad (2)$$

wobei gilt

V_s = Elutionsvolumen der jeweiligen Fraktion
V_O = Ausschlußvolumen
V_t = Bettvolumen

Die Größe der Fragmente in den jeweiligen Fraktionen wurde durch analytische Ultrazentrifugation bestimmt. Nach (39) kann davon ausgegangen werden, daß die DNA solcher einzelner Sepharose-Chromatographie-Fraktionen praktisch monodispers ist. Als Referenzlösung wurde der Auftragspuffer der Säule verwendet. In Abbildung 8 ist das Elutionsprofil dargestellt.
Abbildung 9 zeigt den Zusammenhang zwischen Molekulargewicht und K_{av}-Wert der Säulenfraktionen. In die Abbildung sind zusätzlich die Ergebnisse der Zentrifugation der Chromatographie-Fraktionen aus 6.3.2.2. im neutralen Rohrzucker-Gradienten aufgenommen (Symbol o). Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung der beiden Zentrifugationsverfahren.

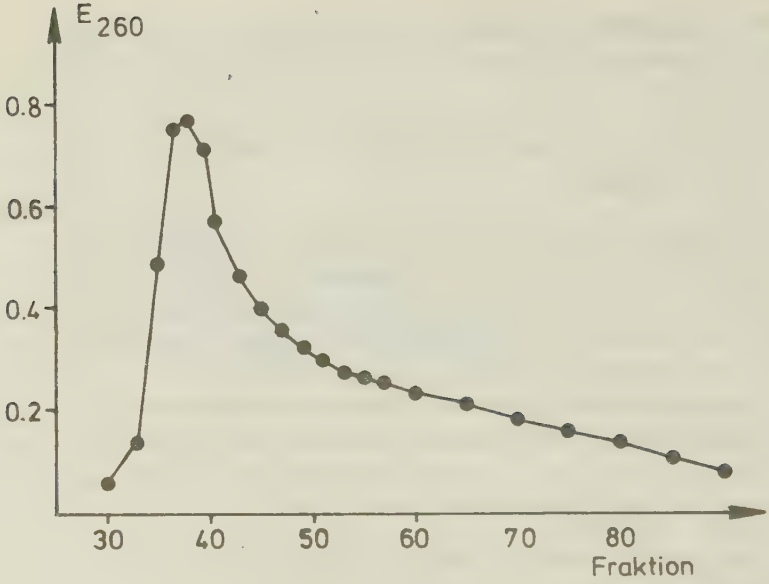

Abb. 8: Auftrennung von DNAase II-Fragmenten an Sepharose IVB nach 4.14.
Fraktionsgröße 1,3 ml, Flußgeschwindigkeit 8 ml/min.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Eichung zusammengefaßt.

Fraktion Nr.	K_{av}	S-Wert	Mol.Gew. x 10^{-6}
65	0,282	8,94	0,627
70	0,398	7,80	0,423
75	0,480	7,20	0,335
80	0,563	6,46	0,245
85	0,729	4,57	0,091

Tab. 2: Ergebnisse der Eichung der Sepharose IVB-Säule.

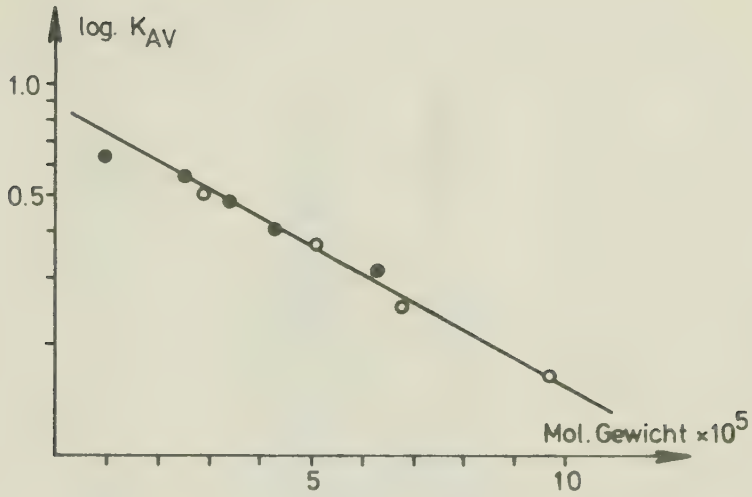

Abb. 9: Eichkurve für die Molekulargewichtsbestimmung mit der Sepharose-Säule.
●–● durch analytische Ultrazentrifugation der Fraktionen erhaltene Werte.
○–○ durch neutrale Rohrzucker-Gradientenzentrifugation erhaltene Werte (s. Abb. 10 und 11).

6.3.2.2. Größenbestimmung der kleinsten Kryolysefragmente

Zur Bestimmung wurde Ascites-DNA 5 h in Kulturmedium inkubiert, das 1 µCi/ml ^{3}H-Thymidin und 10^{-6} M nichtmarkiertes Thymidin enthielt. Die Isolierung der DNA erfolgte nach 4.5. Nach der Isolierung wurde nach 4.8. fragmentiert und gegen den Auftragspuffer dialysiert.
Es wurden 10 ml der DNA-Lösung auf einer Sepharose-Säule nach 4.11. aufgetragen. Das Ausschlußvolumen der Säule war 47 ml. Es wurden Fraktionen zu 1,3 ml aufgefangen.
Die Höhe des Gelbettes war 91 cm.
Das Ergebnis des Säulenlaufs ist in Abbildung 10 dargestellt.

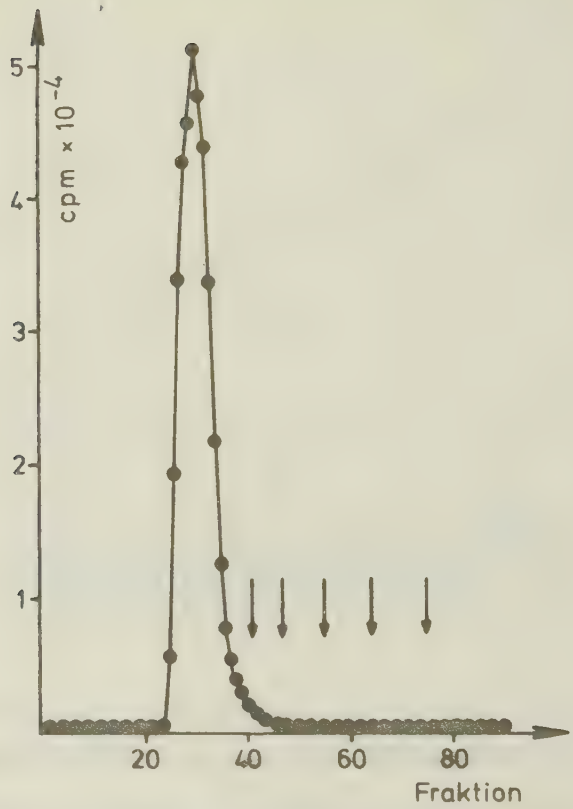

Abb. 10: Auftrennung der Fragmente der Kryolyse durch Chromatographie an Sepharose IVB.
Die Pfeile geben die Fraktionen an, die durch Rohrzucker-Gradientenzentrifugation analysiert wurden.

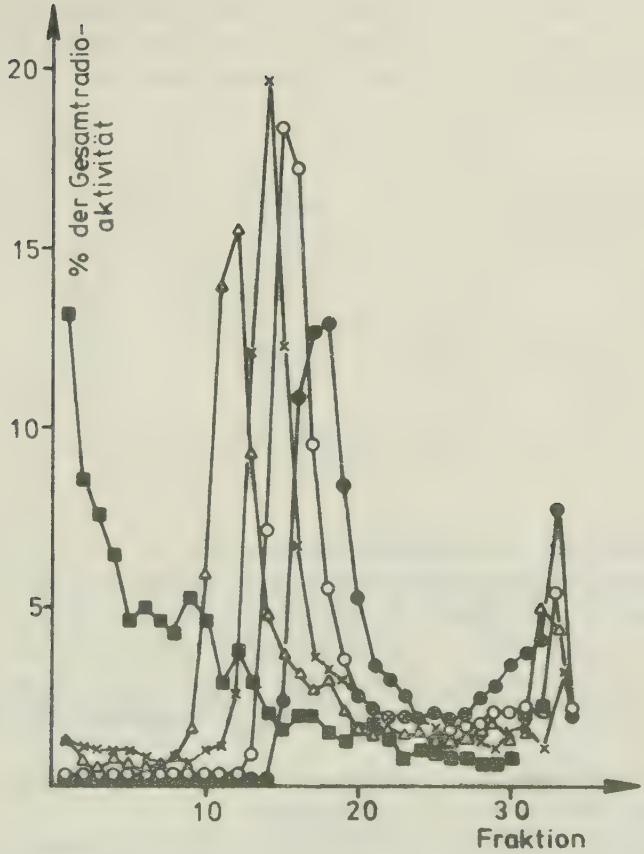

Abb. 11: Neutrale Rohrzucker-Gradientenzentrifugation der mit Pfeil gekennzeichneten Fraktionen aus Abb. 10. Bedingungen: Rotor SW40ti, 5-30 %, 5°C, Laufzeit 18 h.
Symbole: •—• Fraktion 41 (10943 cpm), ○—○ Fraktion 47 (5271 cpm), ×—× Fraktion 55 (3670 cpm), △—△ Fraktion 64 (2326 cpm), ■—■ Fraktion 75 (4714 cpm).

Von den Fraktionen 41, 47, 55, 64 und 75 wurden die Sedimentationskoeffizienten durch Rohrzuckergradienten-Zentrifugation (Abbildung 11) nach 4.10. bestimmt. In Tabelle 3 sind die K_{av}-Werte und die Sedimentationskoeffizienten zusammengefaßt:

Fraktion Nr.	K_{av}	S-Wert	Mol.Gew. x 10^{-6}
41	0,163	10,45	0,971
47	0,252	9,20	0,681
55	0,371	8,32	0,510
64	0,505	6,81	0,289

Tab. 3: Parameter der Säulenfraktionen aus 6.3.2.2.

Wie weit eine Exponentialverteilung auch bei den kleinsten Kryolyse-Fragmenten verwirklicht ist, wurde graphisch überprüft (Abbildung 12). Unterhalb ca. 5 x 10^5 Dalton wird die DNA durch die Sepharose-Säule hinreichend gut nach der Kettenlänge fraktioniert. Die Fragmente dieses Größenbereichs sind nach Abbildung 12 exponential verteilt.

Der Hauptanteil der Fragmente wird mit dem Ausschlußvolumen eluiert (ab ca. 8 x 10^5 Dalton).
Wie aus Abbildung 11 hervorgeht, läßt sich bis herab zu einem Molekulargewicht von ca. 200000 D das Molekulargewicht durch neutrale Rohrzucker-Gradientenzentrifugation bestimmen.
Unterhalb dieser Grenze kann kein eindeutiges Sedimentationsprofil mehr erhalten werden.
Ein Molekulargewicht von 200000 D entspricht einer Länge von 0,1 µm.
Da sich unterhalb dieser Länge keine definierbaren DNA-Bruchstücke mehr befinden und der in diesem Bereich nach-

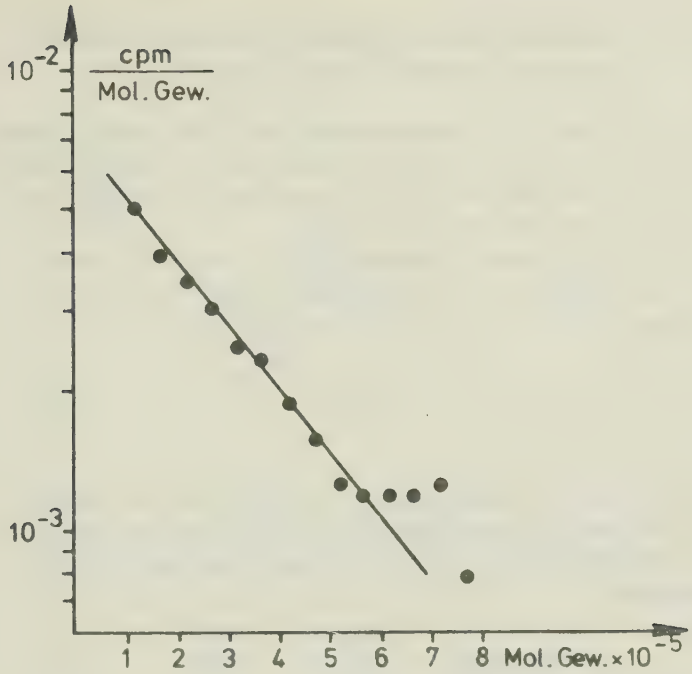

Abb. 12: Testung der kleinsten Kryolyse-Fragmente auf Exponentialverteilung.

weisbare Anteil der gesamten DNA-Menge der Fragmente kleiner als 0,09 % ist, wurde in Übereinstimmung mit LYSCOV und MOSHKOVSKI (30) 0,1 µm als unterste Grenze für die bei der Kryolyse entstehenden Fragmente angenommen. Die in die Modellrechnungen eingehenden Exponentialverteilungen brechen bei diesem Wert ab.

6.3.3. Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung durch Rohrzucker-Gradientenzentrifugation

Auf Grund der im vorausgegangenen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse wurde bei der Bestimmung der Längenverteilung der Kryolysebruchstücke davon ausgegangen, daß die Fragmente exponential verteilt sind.
Beim Vorliegen einer Exponentialverteilung gilt nach (38) für das Verhältnis von "Peak"-Molekulargewicht (M_p) zu "Number-Average"-Molekulargewicht (M_n):

$$\frac{M_p}{M_n} = 1{,}66 \qquad (3)$$

M_p kann aus dem Sedimentationskoeffizienten des Gipfels des Sedimentationsprofils im Rohrzucker-Gradienten nach (33) berechnet werden. Für die Berechnung der mittleren Länge gilt:

$$L = M_n \times 0{,}52 \times 10^{-6}\ \mu m \qquad (4)$$

Die DNA aus 6.3.1. wurde nach 4.10. im neutralen Rohrzukker-Gradienten 10 h zentrifugiert. Das Sedimentationsprofil ist in Abbildung 13 dargestellt. Der Sedimentationskoeffizient des Peaks beträgt 19,5 S. Daraus ergibt sich ein "Peak"-Molekulargewicht von $5{,}97 \times 10^6$ Dalton. Das M_n beträgt $3{,}60 \times 10^6$ Dalton und die mittlere Länge ergibt sich zu 1,87 µm. Die vorliegende Exponentialverteilung der Längen ist durch die Angabe der mittleren Länge eindeutig bestimmt.

In Abbildung 14 ist die auf diesem Wege erhaltene Exponentialverteilung dargestellt und mit den aus der analytischen Ultrazentrifugation derselben Probe erhaltenen Daten gegenübergestellt.

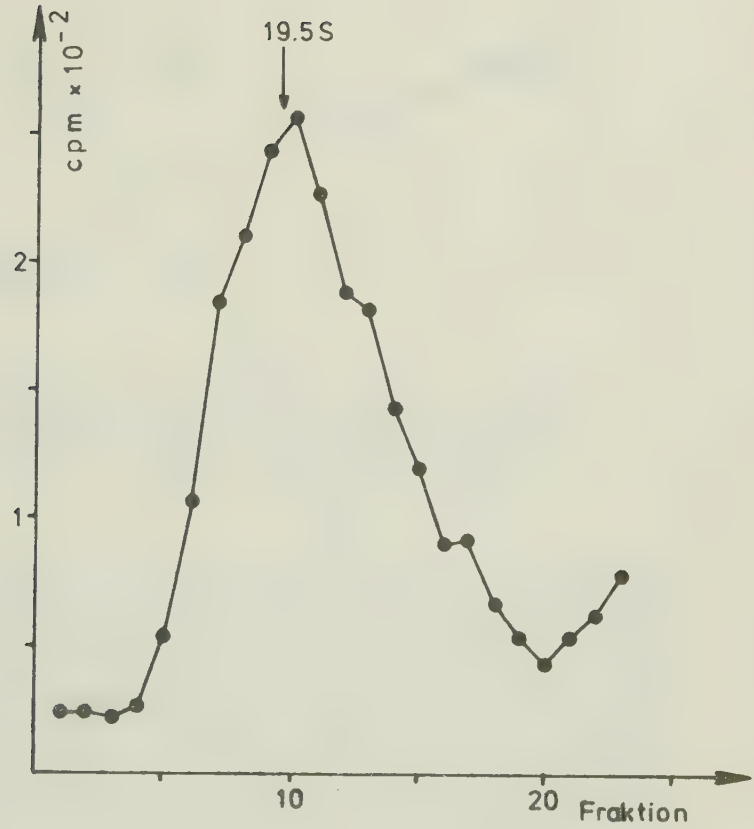

Abb. 13: Neutrale Rohrzucker-Gradientenzentrifugation derselben kryolysierten DNA wie in Abb. 5-7.
Rotor SW40ti, 39000 rpm, 5-30 %, 5°C, Laufzeit 8 h,
Fraktionsgröße 0,6 ml.

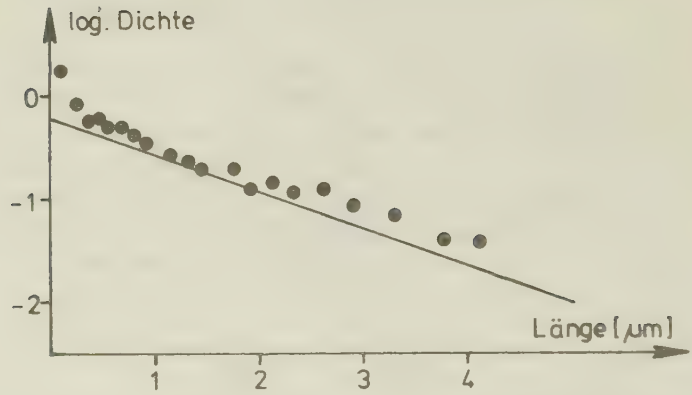

Abb. 14: Längenverteilung kryolysierter DNA. Vergleich der Verteilung aus der Bestimmung mit der analytischen Ultrazentrifuge (•) mit der nach 6.3.3. auf Grund des Rohrzucker-Gradientensedimentationsprofils berechneten Verteilung (—).

In Abbildung 15 wurde überprüft, ob auch im neutralen Rohrzuckergradienten die Exponentialverteilung der Kryolysefragmente verwirklicht ist. Dazu wurden die Sedimentationskoeffizienten nach (33) in Molekulargewichte umgerechnet und gegen den Koeffizienten aus cpm/Molekulargewicht aufgetragen. Da aus experimentellen Gründen nur im Bereich des Gipfels und des abfallenden Astes des Sedimentationsprofils mit einer solchen Verteilung zu rechnen ist, wurden nur diese Fraktionen überprüft. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, ist die Exponentialverteilung auch hier über große Bereiche verwirklicht.

Die schließlich benutzte Molekulargewichtsverteilung ist eine über den Gipfel der Rohrzucker-Gradientenzentrifugation auf dem hier beschriebenen Wege erhaltene Exponentialverteilung, die bei Unterschreitung eines Molekulargewichts von 200000 D (= 0,1 µm) abbricht.

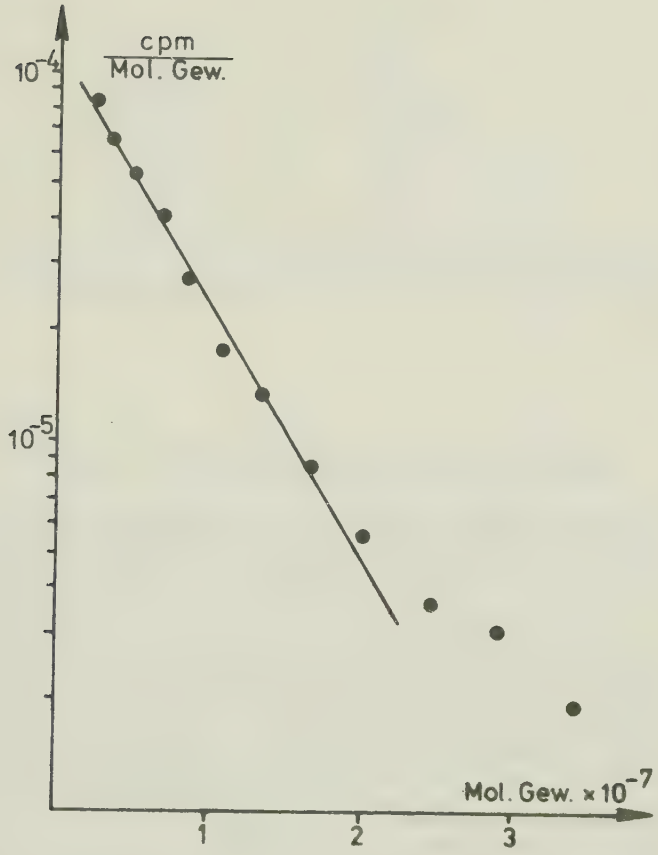

Abb. 15: Prüfung der Daten aus Abbildung 13 auf Exponentialverteilung.

6.4. Berechnung der Korrekturfaktoren für zusätzlich in die S-Phase eintretende Zellen

Auf Grund des Wachstums einer asynchronen Zellpopulation treten während der Versuchsdauer mehr Zellen in die S-Phase ein als Zellen aus der S-Phase austreten. Dieser Fehler spielt bei kürzeren Versuchszeiten eine untergeordnete Rolle. Bei einer Versuchsdauer von 6 Stunden und einer S-Phasendauer von ca. 11 h (26) muß er jedoch berücksichtigt werden, da die ^{14}C-Radioaktivität als Bezugsgröße konstant bleibt, jedoch einer immer größer werdenden Menge von DNA-synthetisierenden Zellen entspricht.
Um dies zu berücksichtigen, wurden verschiedene Methoden versucht.

6.4.1. Korrektur über zellkinetische Daten

Es wurde angenommen, daß die Zellen während der Inkubationszeit ein rein logarithmisches Wachstumsverhalten zeigen und sich nach einem Zellzyklus (22 h, (26)) verdoppeln.
In Tabelle 4 ist die Zunahme der Zellen während der Versuchsdauer unter dieser Annahme wiedergegeben. Mit Hilfe dieser Werte wurde die Einbaukurve für die Gesamtradioaktivität (s. Abschnitt 5.) auf die Zahl der Zellen zum Versuchsbeginn korrigiert. Zwischen den berechneten Zeitwerten wurde linear interpoliert. Die Veränderung der Einbaukurve ist in Abbildung 18 wiedergegeben.

Zeit (Min.)	Zellen in S (%)
0	100,00
60	103,24
120	106,50
180	109,91
240	113,44
300	117,10
360	120,81

Tab. 4: Zunahme der Zellen in der S-Phase während der Versuchsdauer. Berechnet nach 6.4.1.

6.4.2. Experimentelle Bestimmung der Korrekturfaktoren

Hierzu wurden einer Maus nach 4.1. Ehrlich-Ascites-Zellen entnommen und unter den selben Bedingungen wie im Hauptversuch (s. 6.6.1.) 6 h lang inkubiert.
In Abständen von 20 Min. wurden Aliquots entnommen und 10 Min. in Medium mit 8 µCi/ml ^{3}H-Thymidin inkubiert. Durch Eingießen in eiskalte Hanks-Lösung wurde der Einbau gestoppt. Gleichzeitig mit dem Start des Pulses wurde ein Aliquot der Zellen zur Zellzahlbestimmung entnommen. Um eine größere Genauigkeit bei der Zählung in der Neubauerzählkammer zu erhalten, wurde die Zellzahl jeder Probe 10 mal bestimmt.
Nach dem Stoppen wurden die Zellen nach 4.15. zur Autoradiographie vorbereitet.

Abbildung 16 zeigt das Ergebnis der Zellzahlbestimmung mit der Neubauerzählkammer. Die Standardabweichung der Zählung lag im Durchschnitt bei 10 %. Die Zunahme der Zellen wurde mit Hilfe einer aus den Daten errechneten Regressionsgeraden erfaßt. Sie ist in Abbildung 16 eingezeichnet.

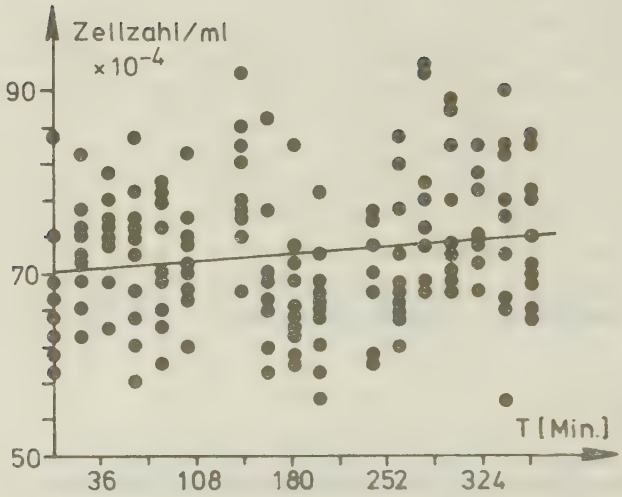

Abb. 16: Wachstum einer Ascites-Zellpopulation unter den Bedingungen des in 6.4.2. beschriebenen Versuchs. Erfassung mit der Neubauer-Zählkammer. Die Punkte stellen die Ergebnisse der Auszählung von jeweils 0,1 ml Kulturflüssigkeit dar. Regressionsgerade $y = 1{,}08 \times 10^{-2} x + 70{,}3$ ($P < 0{,}05$ (Nullhypothese)).

Der Korrelationskoeffizient betrug 0,160 bei 168 Freiheitsgraden. Der Korrelationskoeffizient ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % signifikant von Null verschieden. Es zeigt sich, daß sich die Zellen während der Versuchsdauer geringfügig vermehren.

Die Anzahl der Zellen, die sich in der S-Phase befinden, wurde autoradiographisch bestimmt. Bei der angewandten Methode wurden nur die Zellen markiert, die sich zum Zeitpunkt der Zugabe der Radioaktivität in der S-Phase befanden. Der Thymidin-Markierungsindex ist in Abbildung 17 dargestellt.

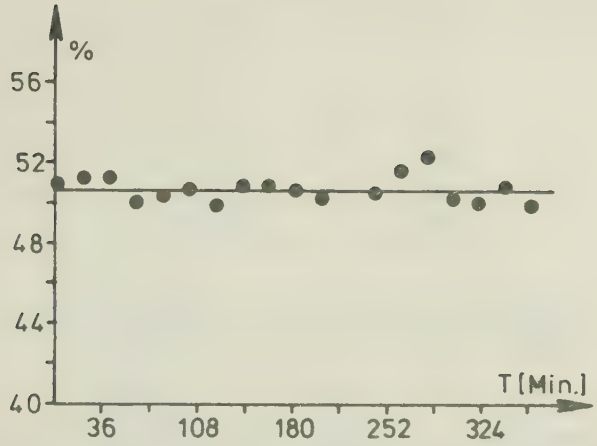

Abb. 17: Bestimmung des Thymidin-Markierungsindex während des Versuchs von Abbildung 16.
Ordinate: % markierte Zellen.

Es wurde auch hier eine Regressionsgerade berechnet. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,0713. Dieser Wert ist bei 18 Meßwerten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % nicht von Null verschieden, sodaß der Markierungsindex während der Versuchsdauer als konstant angesehen werden kann. Die Berechnung ergab, daß sich während der Versuchsdauer 50,72 % der Zellen in der S-Phase befinden.

Mit den Ergebnissen kann jetzt aus der Anzahl der Gesamtzellen die Zahl der Zellen in der S-Phase während der Versuchsdauer berechnet werden. In Tabelle 5 ist die Zahl der Zellen in % der Zellen zum Versuchsbeginn wiedergegeben.

Die Einbaukurve wurde auf die Zellzahl zum Zeitpunkt t = 0 korrigiert. Abbildung 18 zeigt die Veränderung in der Einbaukurve.

Zeit (Min.)	Zellen in S (%)
0	100,00
60	100,89
120	101,78
180	102,68
240	103,57
300	104,46
360	105,35

Tab. 5: Experimentelle Bestimmung der Zunahme der Zellen in der S-Phase während der Versuchsdauer.

Die Erniedrigung der Einbaukurve ist im Falle der Korrektur nach 6.4.1. wesentlich stärker als bei der experimentellen Bestimmung der Korrekturfaktoren. Die Ursache dieser geringeren Abweichung muß wohl darauf zurückgeführt werden, daß die Zellen während der ersten Stunden nach der Explantation kein logarithmisches Wachstum zeigen. Berechnet man auf Grund der vorliegenden Ergebnisse die Verdoppelungszeit der Zellen, so erhält man einen Wert von 83 h. Dieser Wert steht in einem krassen Gegensatz zu den Ergebnissen von PROBST und MAISENBACHER (26), die eine Verdoppelungszeit von 22 h erhielten.
Während der ersten Stunden nach der Explantation befinden sich die Zellen anscheinend in einer "lag"-Phase, sodaß die Korrektur nicht mit den theoretisch berechneten Werten, sondern mit den experimentell bestimmten Werten erfolgen muß.

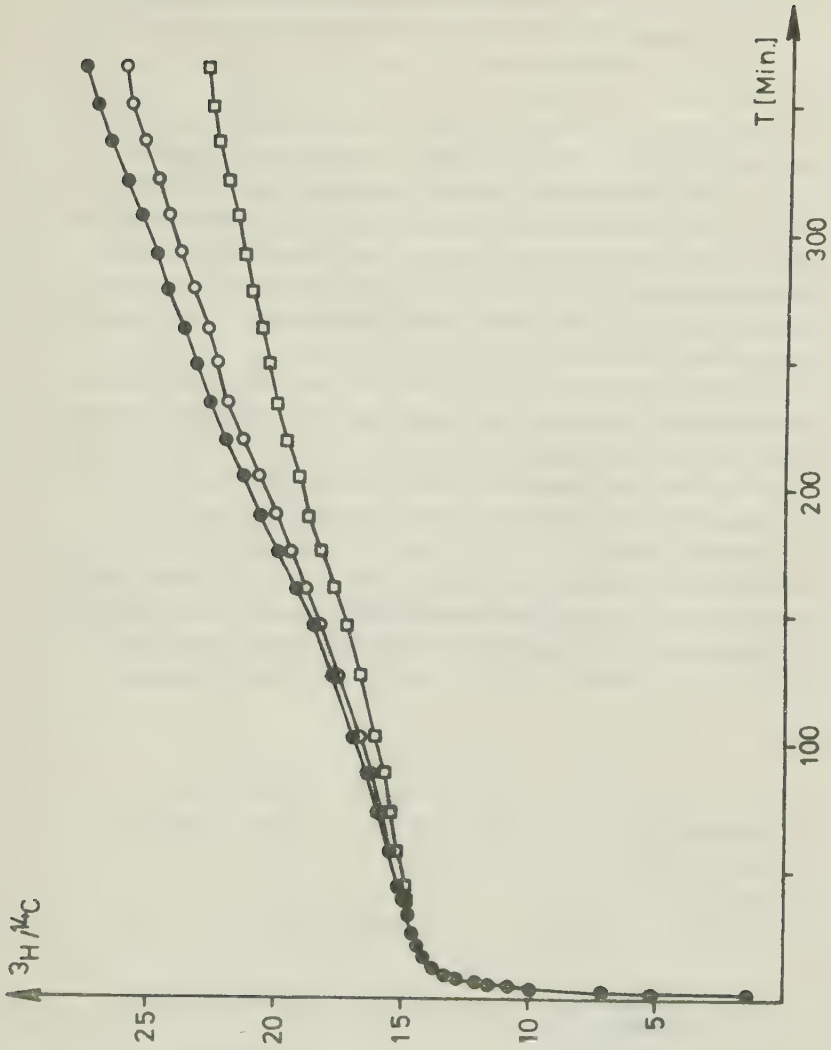

Abb. 18: Veränderungen der Einbaukurve durch Korrektur für zusätzlich in die S-Phase eintretende Zellen.
a) ●–● ohne Korrektur
b) □–□ Korrektur nach 6.4.1.
c) ○–○ Korrektur nach 6.4.2.

6.5. Bestimmung der experimentellen Streuung bei der Ermittlung der Nitrocellulose-bindenden DNA-Radioaktivitäts-Fraktionen

Zur Bestimmung der Streuung der Bindung von "Pulse-Chase"-markierter DNA an Nitrocellulose im Filterbindungstest wurden die Zellen zweier Mäuse nach 4.2.3. mit ^{14}C-Thymidin in vivo vormarkiert. Nach der Entnahme wurden die Zellen nach 4.2.1. einer Pulsmarkierung mit nachfolgendem Chase unterworfen. Die Pulsdauer betrug 2 Min. Das Pulsmedium enthielt zusätzlich zum ^{3}H-Thymidin 10^{-6} M nichtmarkiertes Thymidin.
Nach 4 Min. wurde eine Hälfte der Zellen gestoppt und gewaschen. Die andere Hälfte wurde nach einer Inkubationsdauer von 2 h gestoppt.
Nach dem Waschen wurden die Zellen jedes Zeitwertes in 8 gleiche Portionen aufgeteilt und anschließend nach 4.5. die DNA isoliert.
Nach der Isolierung wurde die DNA nach 4.8. fragmentiert und nach 4.9. dem Filterbindungstest unterworfen. Zusätzlich wurden Sedimentationskoeffizienten nach 4.10. bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 6 wiedergegeben.

	4 Min.	120 Min.
^{3}H-Bindung [%]	41,40 ± 3,30	7,89 ± 1,00
^{14}C-Bindung [%]	4,97 ± 0,85	4,20 ± 0,85
S-Wert [S]	15,07 ± 0,37	

Tab. 6: Ergebnisse der Bestimmung der experimentellen Streuung.

Wie aus Tabelle 6 zu entnehmen ist, sind die Streuungen, die beim Filterbindungstest auftreten, erheblich. Vor allem die Streuung bei der Bindung der ^{14}C-Radioaktivität

ist mit 20 % verhältnismäßig groß. Außerdem ist der absolute Wert der Hintergrundbindung mit 4-5 % zu hoch. Er sollte nach STUMPF (23) etwa bei 1-2 % liegen.
Sowohl die Streuung als auch die zu hohe Hintergrundbindung könnten durch die Aufarbeitung oder durch die Fragmentierung verursacht werden.
Die Präparation erfolgte zur Schonung der empfindlichen Gabelstrukturen bei sehr hohen DNA-Konzentrationen (bis 200 µg/ml). Bei diesen Konzentrationen kann es bei der Enzymbehandlung mit RNAase und Proteinase K zu einer unvollständigen Verdauung kommen. Nach STUMPF ist eine ineffektive Verdauung eine Ursache für eine zu hohe Hintergrundbindung.
Eine andere Ursache für eine zu hohe Bindung an Nitrocellulose kann die Fragmentierung durch Kryolyse sein. Eine ineffektive Kryolyse hat zu große Fragmente zur Folge, die mehr Radioaktivität tragen. Gegen die Kryolyse als Ursache für die Erhöhung der Bindung spricht der Wert und die relativ kleine Streuung der Sedimentationskoeffizienten.
Die eigentliche Ursache der Streuung und der zu hohen Hintergrundbindung dürfte in der unzureichenden Enzymverdauung zu suchen sein.

6.6. Kinetik der Nitrocellulosebindung radioaktiv markierter DNA bei "Pulse-Chase"-Experimenten

6.6.1. "Pulse-Chase"-Experiment mit asynchronen Zellen. Vergleich von Erwartungswerten aus der Modellrechnung mit experimentellen Daten

Die Markierungsbedingungen für die Durchführung des Experiments sind in 4.2.2. beschrieben. Das Experiment wurde mit den Zellen aus 3 Mäusen durchgeführt, die nach 4.2.3. mit ^{14}C-Thymidin in vivo vormarkiert waren. Die Pulsdauer betrug 2 Min. Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs des Einbaus der Radioaktivität in die DNA wurden in kurzen Abständen Proben entnommen. Die säurefällbare Radioaktivität dieser Proben wurde nach 4.13.3. bestimmt. Die erhaltene (unkorrigierte) Einbaukurve ist die Kurve a in Abbildung 18.

Für die DNA-Isolierung wurden die Proben in größeren Zeitabständen entnommen.
Die DNA eines jeden Zeitwertes wurde nach 4.5. isoliert und nach 4.8. durch Kryolyse fragmentiert. Die Bindung an Nitrocellulose wurde nach 4.9. bestimmt.
Durch Zentrifugation im neutralen Rohrzucker-Gradienten nach 4.10. (Laufzeit 10 h) wurden die Gipfel-Sedimentationskoeffizienten der DNA-proben ermittelt.
Der Mittelwert der erhaltenen Gipfel-Sedimentationskoeffizienten (20,58 ± 1,66, n = 15) wurde als mittlere Länge in der Modellrechnung zugrunde gelegt.

Vor der Berechnung der Erwartungswerte wurden folgende Korrekturen der Eingabedaten vorgenommen:

1. Wegen der unterschiedlichen Zählsysteme beim Filterbindungstest und bei der Bestimmung des Einbaus der Radioaktivität in die DNA, wurde die Einbaukurve mit einem Korrekturfaktor für die unterschiedlichen Zählausbeuten (ermittelt durch inneren Standard, s. 4.13.) multipliziert.

2. Für die in die S-Phase einwandernden Zellen wurde eine Korrektur nach 6.4.2. durchgeführt (in Abbildung 18 Kurve c).

3. Die Nitrocellulose-Bindung der ^{14}C-Vormarkierung liefert ein Maß für den DNA-Anteil, der "unspezifisch" bindet, d.h. dessen Bindung in keinem Zusammenhang mit der Replikation steht. Wie schon erwähnt, kommt diese Bindung durch Aufarbeitungs-Artefakte zustande. Die einzelnen ^{3}H-Bindungswerte wurden entsprechend der dazugehörigen ^{14}C-Bindung korrigiert. Dabei wurde der Anteil der bindenden ^{14}C-Vormarkierung,der über 1,5 % hinausging, als Artefaktbindung angesehen. Von den gemessenen ^{3}H-Bindungswerten wurde der entsprechende Prozentsatz der aus den Einbaukurven entnommenen ^{3}H-Radioaktivität subtrahiert.

Die Modellrechnung ergab für die Replikationsgeschwindigkeit 0,69 µm/Min., für die Replikonlänge 79,4 µm und für die "Wartezeit" τ 234,5 Min. In Abbildung 19 sind die berechneten und experimentellen Werte für die gebundene normierte Radioaktivität dargestellt. Die Kinetik der Bindung an Nitrocellulose zeigt zu Beginn einen sehr steilen Anstieg. Nach Durchlaufen eines Maximums bis 4,5 Min. fällt die Bindung der normierten Radioaktivität langsamer ab, wobei sie jedoch nicht mehr auf Null zurückfällt. Ein gewisser Anteil der Bindung bleibt über den ganzen Versuchszeitraum hinweg auf ein relativ konstantes Niveau erhalten. Dies spiegelt ein Gleichgewichtszustand auf Grund des verlangsamt weitergehenden Tritium-Einbaus wider.

Der χ^2-Test ergab bei 13 Freiheitsgraden einen Wert von 9,55. Dieses Ergebnis berechtigt zu dem Schluß, daß die Abweichungen zwischen der theoretischen Kurve und den Meßpunkten vom statistischen Gesichtspunkt aus mit hoher Wahrscheinlichkeit als zufällig betrachtet werden können.

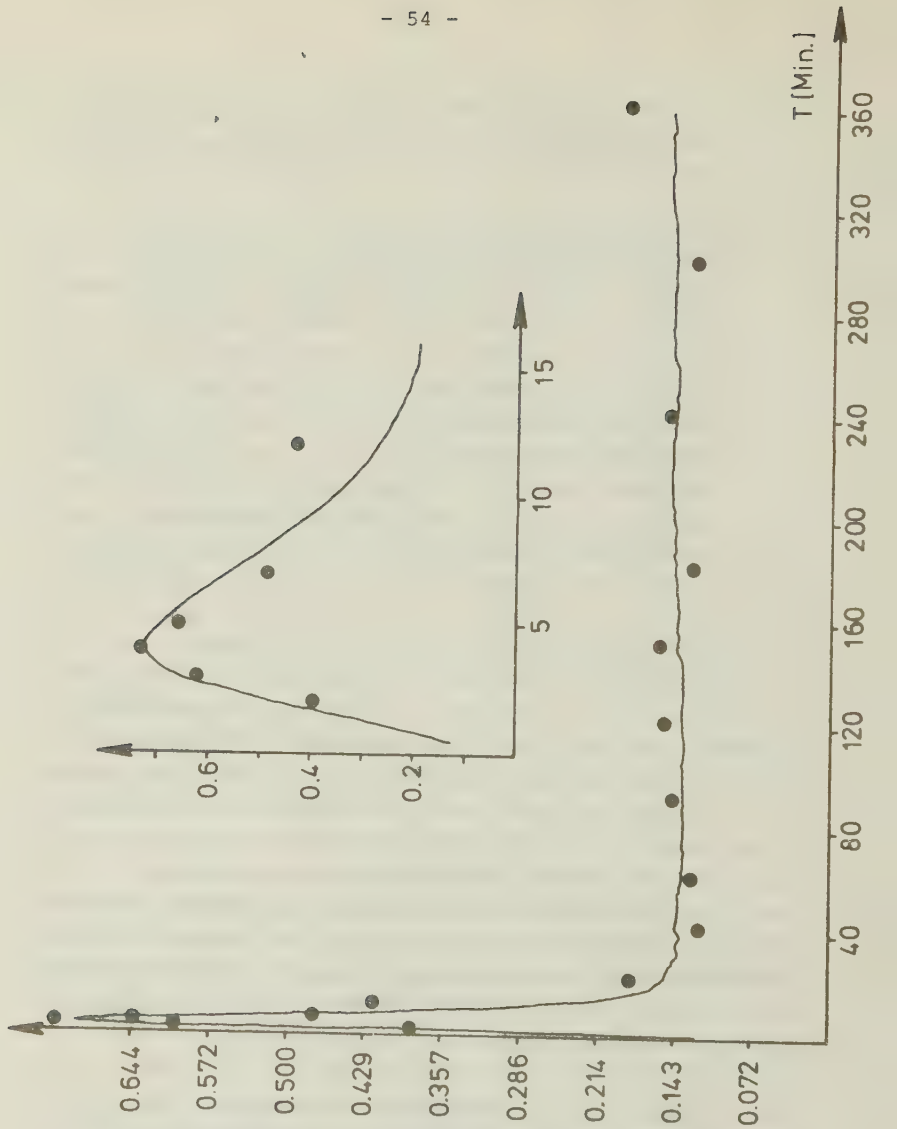

Abb. 19: Aus dem Computer-Modell errechneter Kurvenverlauf der Nitrocellulose-bindenden Radioaktivität. Die zugrundegelegte Einbaukurve ist in Abb. 18 die Kurve c. Die dargestellte (optimierte) Anpassung an die experimentellen Werte (•–•) wurde für folgende Werte der Modellvariablen erhalten: Replikationsgeschwindigkeit: 0,69 µm/Min.;Replikonlänge: 79,4 µm; "Wartezeit": 234,5 Min.
Insert: Anfangsbereich mit gespreizter Abzisse.
Ordinate: gebundene normierte Radioaktivität ^{3}H.

In der Literatur (38, 41-46) werden für verschiedene Zellsysteme Replikonlängen von 49,8 µm (Lungenfibroblasten) bis 84,2 µm (Mäuse 3T3-Zellen) angegeben. Mit Hilfe der Faserautoradiographie wurde durch BLÜTTERS (40) für die in dieser Arbeit verwendeten Zellen eine Replikonlänge von 57,6 - 76,6 µm gefunden. Der mit Hilfe der Nitrocellulosebindungskinetik nach der Durchrechnung mit dem Modell erhaltene Wert von 79,4 µm stimmt sehr gut mit dem von BLÜTTERS gefundenen Wert und mit den Werten für Eukaryontenzellen in der Literatur überein.

Die Replikationsgeschwindigkeit wurde vom Modell zu 0,69 µm/Min. berechnet. Dieser Wert läßt sich gut in das Spektrum der Werte für die Replikationsgeschwindigkeit in der Literatur (38,42,47-49) einordnen. So finden z.B. TSENG und GOULIAN (49) bei Lymphozyten Werte von 0,5 - 1,2 µm/Min. Bei Ehrlich-Ascites-Zellen wurde von BLÜTTERS (40) eine Replikationsgeschwindigkeit von 0,7 - 0,8 µm/Min. gefunden. Ein Wert, der sehr gut mit dem Ergebnis der Modellrechnung übereinstimmt.

KOWALSKI und CHEEVERS (22) beobachteten an Mäuse-Embryozellen, daß die DNA-Replikation 4-8 mal langsamer verläuft, als auf Grund der Replikonlänge und der Replikationsgeschwindigkeit zu erwarten wäre. Als Erklärung für dieses Phänomen nahmen sie an, daß das Zusammenwachsen der Replikationsgabeln ein vom eigentlichen Replikationsprozeß unabhängiger Vorgang ist. Dieses Zusammenwachsen der Helices soll der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Bildung der hochmolekularen Tochter-DNA sein.
Betrachtet man die vom Modell errechnete Replikonlänge von 79,4 µm und die Replikationsgeschwindigkeit von 0,69 µm/Min., so benötigt die Zelle 115 Min., um ein Replikon zu replizieren. Nimmt man nach KOWALSKI und CHEEVERS (22) an, daß die Gesamtreplikation 4-8 mal langsamer verläuft, so erhält man "Wartezeiten" zwischen 343 und 800 Minuten, bis benachbarte Replikons zusammenwachsen.

Der vom Modell errechnete Wert von 234 Min. liegt etwas niedriger als der unterste Wert der Abschätzung. Die Abschätzung, wie sie hier durchgeführt wurde, erlaubt nur sehr grobe Näherungswerte. In der gesamten Literatur gibt es bis jetzt noch keine gesicherten Daten über die Dauer von "Wartezeiten" bei der Bildung der "chromosome sized"-Tochter-DNA, sodaß eine Wertung der erhaltenen Differenz unterbleibt.

6.2.2. "Pulse-Chase"-Experiment mit synchronen Zellen

Um einen Hinweis auf die postulierten "Wartezeiten" zu erhalten, wurde ein "Pulse-Chase"-Experiment mit synchronen Zellen durchgeführt.
Zur Synchronisierung der Zellen wurde eine Zonalzentrifugation nach 4.3. durchgeführt und nach 4.4. eine synchrone in vitro-Kultur angelegt.
Für die Kultur wurden ca. 380 x 10^6 Zellen aus der G1-Phase entnommen und in ein Kulturmedium gegeben, das neben 10^{-4} M Amethopterin die Supplemente Serin (10^{-4} M), Glycin (10^{-4} M) und Adenosin (5 x 10^{-5} M) enthielt und 12 h auf diesem Blockmedium belassen.
Da eine in vivo Vormarkierung der DNA mit ^{14}C-Thymidin mit synchronisierten Zellen schlecht durchzuführen ist, auf eine Vormarkierung jedoch nicht verzichtet werden kann, wurden zusätzlich Zellen aus der frühen S-Phase entnommen und in einem Kulturmedium mit 0,01 µCi/ml ^{14}C-Thymidin 10 h wachsen lassen. Nach 10 h wurde die Kultur mit warmem Blockmedium versetzt, die Zellen abzentrifugiert, in warmes Blockmedium aufgenommen und 2 Stunden bei 37°C belassen. Dadurch wurde ereicht, daß das in den Pools vorhandene ^{14}C-Thymidin völlig verbraucht wurde.
Vor Beginn des eigentlichen Experiments wurden so viel ^{14}C-Thymidin-markierte Zellen zu der G1-Zellen-Kultur gegeben, daß ungefähr 3 % der Zellen mit ^{14}C markiert waren.

Bevor der Block aufgehoben wurde, wurden die Zellen geteilt und abzentrifugiert. Die eine Hälfte der Zellen (Kultur I) wurde in 10 ml supplementiertes Medium aufgenommen, das 50 µCi/ml ^{3}H-Thymidin enthielt. Bei den anderen Zellen (Kultur II) wurde der Block mit 10^{-6} M nichtmarkiertem Thymidin aufgehoben. Der Start der beiden Kulturen durch die Blockaufhebung erfolgte gleichzeitig.

Nach einer Pulsdauer von 2 Minuten wurden die Zellen der Kultur I in das 50-fache Volumen supplementiertes Medium, das 10^{-5} M nichtmarkiertes Thymidin enthielt, überführt. Nach 4 Minuten und 8 Minuten wurden jeweils 100 ml durch Eingießen in eiskalte Hanks-Lösung gestoppt.
Während der Inkubation wurden 3/5 der Kultur in der Wärme abzentrifugiert und in 100 ml supplementiertes Kulturmedium aufgenommen, das 10^{-6} M nichtmarkiertes Thymidin enthielt,und nach 30, 180 und 420 Minuten je 30 ml gestoppt. In kurzen Abständen wurden während der gesamten Inkubation Aliquots zur Bestimmung des Einbaus der Radioaktivität entnommen und die Radioaktivität nach 4.13.3. bestimmt.

Nach 165 Minuten wurde die Kultur II abzentrifugiert und in 18 ml supplementiertes Medium aufgenommen. Bei 180 Minuten wurde durch Zugabe von ^{3}H-Thymidin (50 µCi/ml) gestartet. Nach einer Pulsdauer von 5 Minuten wurde wie bei Kultur I verfahren. Die Entnahmezeiten für Proben zur DNA-Isolierung waren bei 186, 190, 210, 300 und 420 Minuten. Die Zeitangaben beziehen sich auf den Start der Kultur I.

Die Isolierung der DNA erfolgte nach 4.5. Nach der Isolierung wurde nach 4.8. durch Kryolyse fragmentiert und der an Nitrocellulose bindende Anteil im Filterbindungstest nach 4.9. bestimmt. Die mittleren Längen wurden durch Zentrifugation im neutralen Rohrzucker-Gradienten bestimmt. In Abbildung 20 ist der Verlauf der Bindung der ^{3}H-Radioaktivität an Nitrocellulose in Abhängigkeit der Zeit dargestellt.

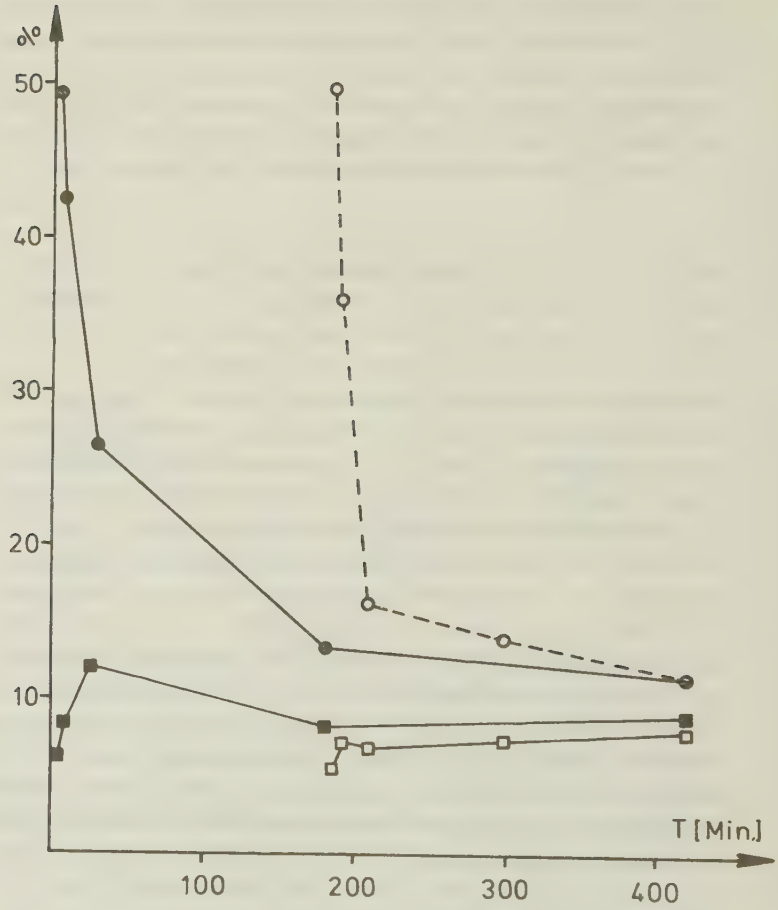

Abb. 20: Ergebnis des Experiments mit synchronen Zellen aus 6.6.2.
Die Zellen wurden einem Amethopterin-Block unterworfen. Sofort nach Blockaufhebung und nach 3 h wurde eine "Pulse-Chase"-Markierung durchgeführt. Die DNA wurde isoliert und die Bindung der Radioaktivität an Nitrocellulose nach 4.9 bestimmt.
Kultur I: ●—● % Bindung ^{3}H, ■—■ % Bindung ^{14}C
Kultur II: ○—○ % Bindung ^{3}H, □—□ % Bindung ^{14}C

Auf eine statistische Durchrechnung der Daten mußte hier verzichtet werden, da das bisherige Modell nur für asynchrone Zellpopulationen geeignet ist. Hier sollte nur qualitativ das Vorhandensein einer "Wartezeit" untersucht werden.
Der Kurvenverlauf in Abbildung 20 zeigt bei der Kultur II einen steileren Abfall der Bindung der ^{3}H-Radioaktivität als bei der Kultur I. Nach KOWALSKI und CHEEVERS (22) wächst die Geschwindigkeit, mit der die Replikationsgabeln verschmelzen, in der späteren S-Phase. Damit müßte die Fähigkeit der DNA,an Nitrocellulose zu binden, in der Kultur II schneller abnehmen als in der Kultur I. Dies konnte, wie aus Abbildung 20 hervorgeht, experimentell bestätigt werden. Konsistente Ergebnisse wurden am gleichen Zellmaterial durch alkalische Rohrzucker-Gradientenzentrifugation der nach demselben "Pulse-Chase"-Schema markierten DNA erhalten (50).

Die mit der Modellrechnung und mit Hilfe von synchronen Zellen gewonnenen Erkenntnisse lassen den Schluß zu, daß es sinnvoll erscheint, auch für zukünftige Modelle eine "Wartezeit" beim Verschmelzen der Replikationsgabeln zu fordern.
Die Ergebnisse insgesamt zeigen, daß der Vergleich experimenteller Daten mit der statistischen Durchrechnung mit mathematisch formulierten Replikationsmodellen ein sinnvoller Weg zur Erforschung der Mechanismen der DNA-Replikation ist.

7. Zusammenfassung

Da DNA aus Säugetierzellen, die eine oder mehrere Replikationsgabeln enthält, selektiv an Nitrocellulose bindet, ist es prinzipiell möglich, die Kinetik der Bindung einer in die DNA eingebauten radioaktiven Markierung an Nitrocellulose vorauszusagen. Die Berechnung von experimentell nachprüfbaren Erwartungswerten für die Bindung der Radioaktivität an Nitrocellulose erfordert neben der Formulierung bestimmter Annahmen über den Ablauf der Replikation noch zusätzliche Bedingungen für die Eingabegrößen. Ziel dieser Arbeit war es, die Randbedingungen für die Eingabe der experimentellen Daten abzuklären.

Eine außerordentlich wichtige Voraussetzung ist die exakte Erfassung der Molekulargewichtsverteilung in den untersuchten DNA-Proben. Die direkte Analyse beliebiger Fragmentverteilungen mit der analytischen Ultrazentrifuge erwies sich als kein geeigneter Weg. Daher wurde auf eine Fragmentierungsmethode, die DNA-Kryolyse nach LYSCOV und MOSHKOVSKI (3o), ausgewichen, die aus theoretischen Erwägungen oberhalb einer Minimal-Fragmentgröße exponential verteilte Fragmente liefern sollte.
Die postulierten Exponentialverteilungen konnten experimentell verifiziert werden. Die Minimal-Fragmentgröße wurde zu 0,1 µm ermittelt.

Ein Routineverfahren zur Feststellung des mittleren Molekulargewichts in kryolysierten Proben mit Hilfe der Rohrzucker-Gradientenzentrifugation wurde ausgearbeitet, geeicht und auf seine Zuverlässigkeit im vorliegenden Zusammenhang überprüft. Damit sind alle Informationen über Fragmentgrößenverteilungen in kryolysierten Proben in einfacher Weise zugänglich.

Darüberhinaus wurden Korrekturfaktoren für die Zellvermehrung während der Versuchsdauer bestimmt und die Fehlerbrei-

ten aller Teile der angewandten Methodik ermittelt.

Die Existenz einer Variablen des zugrundegelegten Modells, der sog. "Wartezeit", d.h. hier der Zeit, nach der eine bindende Gabel ihre Fähigkeit verliert, an Nitrocellulose zu binden, war durch die existierende Literatur ungenügend gestützt. Sie wurde in einem Experiment an synchronen Zellen demonstriert.

Die Durchrechnung der experimentellen Daten eines "Pulse-Chase"-Experiments mit einem vorläufigen mathematischen Modell ergaben für die Replikationsgeschwindigkeit 0,69 µm/Min., für die Replikonlänge 79,4 µm und für die "Wartezeit" 234 Min. Diese Werte liegen durchweg innerhalb des Bereichs, der von anderen Autoren angegeben wird. Sie sind in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von faserautoradiographischen Untersuchungen an den gleichen Zellen (Replikationsgeschwindigkeit 0,7 µm/Min., Replikonlänge 57,6-76,6 µm).

Literaturverzeichnis

1. KORNBERG, A. (1974) DNA-Synthesis, Freeman & Co., San Francisco, S. 173ff

2. GEFTER, L.M. (1975) Ann. Rev. Biochem 44, 45-78

3. CHARGAFF, E. (1976) Progr. in Nucl. Res. and Mol. Biol. 16, 1-24

4. HEWISH, D.R. (1976) Nucl. Acid. Res. 3, 69-78

5. OLIVERA, B.M., BONHOEFFER, F. (1972) Nature New Biol. 240, 233-235

6. IOANNOU, P. (1973) Nature New Biol. 244, 257-260

7. OKAZAKI, R., OKAZAKI, T., SAKABE, K., SUGIMOTO, K., SUGINO, A. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. US 59, 598-605

8. SUGINO, A., HIROSE, S., OKAZAKI, R. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. US 69, 2691-2695

9. MAGNUSSON, G., PIGIET, V., WINNACKER, E.L., ABRAMS, R., REICHARD, P. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. US 70, 412-415

10. OKAZAKI, R., HIROSE, S., OKAZAKI, T., OGAWA, T. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 1018-1031

11. MEYER, H. (1978) Biochem. Diplomarbeit, Universität Tübingen

12. BERGER, H., IRVIN, L.J. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. US 65, 152-159

13. HABENER, J.F., BYNUM, B.S., SHACK, J. (1969) Biochim. Biophys. Acta 195, 484-493

14. GOLDSTEIN, N.O., RUTMAN, R.J. (1973) Nature New Biol. 244, 267-269

15. PROBST, H., ULLRICH, A., KRAUSS, G. (1971) Biochim. Biophys. Acta 254, 15-29

16. HAYTON, G.J., PEARSON, C.K., KEIR, H.M. (1973) Biochem. Soc. Trans., 534th Meeting, Nottingham, 452-455

17. HAYTON, G.J., PEARSON, C.K., SCAIFE, J.R., KEIR, H.M. (1973) Biochem. J. 131, 499-508

18. OISHI, M. (1968), Proc. Nat. Acad. Sci. US 60, 691-698

19. PROBST, H., JENKE, H.-S., GENTNER, P.R., HOFSTAETTER, Th. (1975) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 356, 635-645

20. PROBST, H., HOFSTAETTER, Th., JENKE, H.-S., GENTNER, P.R., WAIS, R. (1974) Biochim. Biophys. Acta 366, 11-27

21. LANOTTE, M., MOERMAN, C., PANIJEL, J. (1977) Exp. Cell. Res. 109, 191-200

22. KOWALSKI, J., CHEEVERS, W.P. (1976) J. Mol. Biol. 104, 603-615

23. STUMPF, Chr. (1977) Inaugural Dissertation, Universität Tübingen

24. KARZEL, K. (1965) Med. Pharmakol. Exp. 12, 137-142

25. SCHINDLER, R., DAY, M., FISCHER, G.A. (1959) Cancer Res. 19, 47-53

26. PROBST, H., MAISENBACHER, J. (1973) Exp. Cell Research 78, 335-344

27. MAISENBACHER, J. (1973) Inaugural Dissertation, Universität Tübingen

28. PAOLETTI, C., DUTHEILLET-LAMONTHEZIE, N., IEANTEUR, Ph., OBRENOWITCH, A. (1967) Biochim. Biophys. Acta 149, 435-450

29. THOMAS, M., DAVIS, R.W. (1975) J. Mol. Biol. 91, 315-328

30. LYSCOV, V.N., MOSHKOVSKY, Y.S. (1969) Biochim. Biophys. Acta 190, 101-110

31. FRATERMAN, A. (1975) Biochem. Diplomarbeit, Universität Tübingen

32. ELIAS, H.-G., Ultrazentrifugenmethoden, Beckman Instruments GmbH, München 1969, S. 170ff

33. STUDIER, F.W. (1965) J. Mol. Biol. 11, 373-390

34. BLÜTTERS, R. (1974) Biochem. Diplomarbeit, Universität Tübingen

35. GAHAN, P.B. (1972) Autoradiography for Biologists, Acad. Press, London, New York, S. 48

36. BURGI, E., HERSHEY, A.D. (1963) Biophys. J. 3, 306-308

37. LYSCOV, V.N. (1969) Biochim. Biophys. Acta 190, 111-115

38. LEHMANN, A.R., ORMEROD, M.G. (1970) Biochim. Biophys. Acta 204, 128-143

39. PRUNELL, A., BERNARDI, G. (1973) J. Biol. Chem. 103, 3433-3440

40. BLÜTTERS, R., (1978) Inaugural Dissertation, Universität Tübingen

41. OCKEY, C.H., SAFFHILL, R. (1976) Exp. Cell Res. 103, 361-373

42. HUBERMAN, J., RIGGS, A.D. (1968) J. Mol. Biol. 32, 361-373

43. HAND, R., TAMM, I.J. (1974) J. Mol. Biol. 83, 175-183

44. HAND, R. (1975) J. Cell Biol. 64, 89-97

45. MCFARLANE, P.W., CALLAN, H.G. (1976) J. Cell Science 13, 821-839

46. VAN 'T HOFF, J. (1975) Exp. Cell Res. 93, 95-104

47. PAINTER, R.B., SCHAEFER, A.W. (1969) J. Mol. Biol. 45, 467-479

48. HAND, R., TAMM, I.J. (1973) J. Cell Biol. 58, 410-418

49. TSENG, B.Y., GOULIAN, M. (1975) J. Mol. Biol. 99, 317-337

50. GEKELER, V. pers. Mitteilung

51. PROBST, H., HOFSTAETTER, Th., STUMPF, Ch., FRATERMAN, A. (1978) zur Publikation eingereicht

Lebenslauf

Am 8. April 1948 wurde ich als erster Sohn des Bauingenieurs Jan Fraterman und seiner Ehefrau Dini, geb. van den Burg in Den Haag/Niederlande geboren. Von 1954 bis 1960 besuchte ich in Arnhem/Niederlande die Grundschule und von 1960 bis 1962 das Thorbecke-Lyzeum. Nach der Übersiedelung meiner Familie in die Bundesrepublik besuchte ich in Düsseldorf von 1962 bis 1964 das Geschwister-Scholl-Gymnasium und von 1964 bis 1966 die Ludwigs-Oberrealschule in München. Ab 1966 besuchte ich in Ansbach/Mfr. das Platen-Gymnasium, an dem ich 1969 die Reifeprüfung ablegte.
Im Wintersemester 1969/70 begann ich an der Universität Tübingen mein Biochemie-Studium, das ich am 11. September 1975 mit der Diplomprüfung abschloß. Seit Oktober 1975 arbeitete ich am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Probst an meiner Dissertation mit dem Thema "Modell für die Organisation der Verdoppelung des Säugergenoms. Vergleich experimenteller Daten mit Erwartungswerten aus der statistischen Durchrechnung eines mathematischen Modells", die ich im Juni 1978 abschloß.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:
Physiologische Chemie: G. Weitzel, H. Probst
Organische Chemie: E. Müller, E. Bayer
Physikalische Chemie
und -Biochemie: H. Mauser, E. Kortüm, H. Wenck, K. Wegmann
Botanik: H. Metzner, E. Bünning
Zoologie: K.G. Grell, V. Schwartz
Mikrobiologie: H. Zähner
Mathematik: W. Schweizer
Physik: H. Krüger
Anatomie: K. Mörike
Physiologie: F. Möhres
Pharmakologie: H. Remmer

ifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 0951/6 4321